

**Interação entre fatores oceanográficos, expressão de
proteínas e a atividade de proteases em *Stramonita
brasilensis***

Autor: Gustavo Gesini Britto
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Adriano Christofoletti
Coorientador: Profa. Dra. Andrezza Justino Gozzo
Andreotti

Financiamento FAPESP-processo nº 2018/00772-7

Santos
2019

Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
PPG em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira

Gustavo Gesini Britto

**Interação entre fatores oceanográficos, expressão de
proteínas e a atividade de proteases em *Stramonita
brasiliensis***

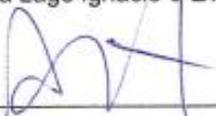
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e
Costeira da Universidade Federal de São Paulo para a
obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Adriano Christofolletti
Coorientador: Profa. Dra. Andrezza Justino Gozzo
Andreotti

Santos
2019

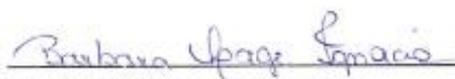
ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E ECOLOGIA MARINHA E COSTEIRA

Ao trigésimo dia do mês de outubro de 2019, às 9:00 horas, foi realizada na sala 334, localizada na Rua Silva Jardim nº 136 – 3º andar, a defesa pública da dissertação de mestrado do aluno **Gustavo Gesini Britto**, intitulada "INTERAÇÃO ENTRE FATORES OCEANOGRÁFICOS E A PRODUÇÃO DE PROTEASES EM ORGANISMOS MARINHOS".

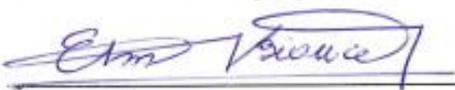
A Banca Examinadora, constituída pelos professores doutores Alessandra da Silva Augusto, Barbara Lage Ignácio e Éverson Miguel Bianco emitiu o seguinte parecer:



Profª. Drª. Alessandra da Silva Augusto aprovado () reprovado



Profª. Drª. Barbara Lage Ignácio aprovado () reprovado



Prof. Dr. Éverson Miguel Bianco aprovado () reprovado

Em caso de reprovação, é necessária a apresentação de um parecer consubstanciado no espaço designado abaixo:

Eu, Ronaldo Adriano Christofolletti, orientador e presidente da banca, lavrei a presente Ata que segue por mim assinada e pelos demais membros da Banca Examinadora.



Prof. Dr. Ronaldo Adriano Christofolletti

Ficha catalográfica elaborada pelo autor

Britto, Gustavo.G., 1996

Interação entre fatores oceanográficos, expressão de proteínas e a atividade de proteases em *Stramonita brasiliensis*. / Gustavo Britto; Orientador Prof. Dr. Ronaldo Adriano Christofolletti; Coorientadora Prof^a Dr^a Andrezza Justino Gozzo Andreotti. --Santos, 2019.

67 f.: il. color ; 30cm

Dissertação (Mestrado - Pós Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira) -- Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, 2019

1. Gastrópode. 2. proteases. 3. costão rochoso. 4. exposição às ondas. 5. produtividade primária. I. Christofolletti, Ronaldo, Orient. II. Andreotti, Andrezza, Coorient. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais Edmilson e Heloisa. Não teria chegado até aqui sem vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos ao longo de mais essa etapa.

Aos meus pais por todo o amor e compreensão. O apoio de vocês foi essencial mesmo distante.

Aos meus orientadores por toda a paciência e ensinamentos ao longo deste período. Levarei os aprendizados pelo resto da vida.

À Beatriz por todo o carinho, amor e cuidado durante o período em que mais precisei. Você é fundamental na minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcos Leoni Gazarini Dutra por gentilmente ter concedido o uso aos equipamentos de seu laboratório.

Ao MSc. André Luiz Pardal-Souza por ter se disposto a nos ajudar nas análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2018/00772-7) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (AP FAPESP 2016/24551-4).

Resumo

Os costões rochosos são ambientes dinâmicos, onde fatores oceanográficos mudam combinados ao ciclo das marés. Os organismos habitantes desses costões rochosos, como a *Stramonita sp.*, possuem adaptações para lidar com a pressão ambiental, como mudanças na expressão de proteínas, capazes de mudar o seu metabolismo em situações de estresse. Entre essas proteínas estão as proteases, enzimas que participam de processos fundamentais para o crescimento e sobrevivência dos organismos. Neste estudo interdisciplinar, buscamos verificar a relação entre fatores oceanográficos, a expressão de proteínas e a atividade de proteases em *Stramonita brasiliensis*. Foram coletados organismos e dados ambientais, como a exposição às ondas, temperatura superficial da água (TSM) e produtividade primária, em 13 costões rochosos do litoral sul de São Paulo ao norte do Rio de Janeiro. Foram escolhidos 5 organismos de cada costão rochoso de acordo com sua massa sem a concha, os quais foram avaliados quanto a expressão de proteínas e a atividade de proteases. Nos organismos desses costões rochosos, a expressão de proteínas teve uma relação inversa com a atividade de proteases. As variáveis oceanográficas influenciaram tanto a expressão de proteínas como a atividade de proteases. Em áreas mais quentes (TSM maior do que 25°C) foram observadas as maiores concentrações de proteínas, mas nas áreas mais frias (TSM menor do que 25°C) foram observadas as maiores atividades enzimáticas de proteases. Esses resultados mostram que os fatores oceanográficos influenciam na expressão de proteínas e na atividade de proteases de *Stramonita brasiliensis* e consistem em um avanço para a compreensão das respostas fisiológicas que os invertebrados marinhos possuem em diferentes condições ambientais.

Palavras-chave: Gastrópode, proteases, costão rochoso, temperatura, produtividade primária, exposição às ondas

Abstract

Rocky shores are dynamic environments where oceanographic factors change combined with the tidal cycle. The organisms inhabiting these rocky shores, such as *Stramonita sp.*, Have adaptations to cope with environmental pressure, such as changes in protein expression, capable of changing their metabolism under stress. Among these proteins are proteases, enzymes that participate in fundamental processes for the growth and survival of organisms. In this interdisciplinary study, we sought to verify the relationship between oceanographic factors, protein expression and protease activity in *Stramonita brasiliensis*. Environmental organisms and data such as wave exposure, surface water temperature (SST) and primary productivity (Chl-a) were collected from 13 rocky shores of the south coast of São Paulo north of Rio de Janeiro. Five organisms from each rocky shore were chosen according to their mass without the shell, which were evaluated for protein expression and protease activity. In organisms on these rocky shores, protein expression has an inverse relationship to protease activity. Oceanographic variables influenced both protein expression and protease activity. Protein expression was higher in organisms from areas with SST below 25 °C (cold) than in areas with SST above 25 °C (warm). In warmer areas the highest protein concentrations were observed, but in the colder areas the highest protease enzymatic activities in general were observed. These results show that oceanographic factors influence protein expression and protease activity of *Stramonita brasiliensis* and constitute an advance for the understanding of the physiological responses that marine invertebrates have in different environmental conditions.

Keywords: gastropod, proteases, rocky shore, temperature, primary productivity, wave exposure

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição dos locais amostrados do litoral sul de São Paulo ao litoral norte do Rio de Janeiro.	11
Figura 2. Temperatura superficial média de águas próximas à costa.	17
Figura 3. Concentração de clorofila-a na superfície da água ao longo da costa sudeste brasileira.	17
Figura 4. Atividade enzimática específica do substrato Z-FR-AMC e do substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp nos 13 costões amostrados.	25
Figura 5. Hidrólise do substrato Z-FR-AMC na presença de inibidores clássicos de proteases.	26
Figura 6. Correlação de Pearson entre a expressão de proteínas e as atividades enzimáticas.	28
Figura 7. Interações entre os fatores oceanográficos e a expressão de proteínas (mgg), atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC e com o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp nos 13 costões amostrados.	32
Figura 8. Interações entre os fatores oceanográficos e a atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC em 11 costões amostrados.	34

Lista de tabelas

Tabela 1. Inibidores de proteases utilizados e suas respectivas classes inibidas ...	14
Tabela 2. Variáveis ambientais para os 13 costões rochosos amostrados neste trabalho.	19
Tabela 3. Réplica dos extratos de <i>Stramonita brasiliensis</i>	21
Tabela 4. Expressão de proteínas nos extratos de <i>Stramonita brasiliensis</i>	23
Tabela 5. Sumário das interações obtidas pelo modelo GLM para os fatores clorofila a (Chl-a), grau de exposição às ondas (Exp), temperatura superficial média da água (TSM) e a expressão de proteínas (MGG), a atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC (ZFR) e a atividade no substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (ABZ) nos 13 costões amostrados	31
Tabela 6. Sumário das interações obtidas pelo modelo GLM para os fatores clorofila a (Chl-a), grau de exposição às ondas, temperatura superficial média da água (TSM) e a atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC nos 11 costões amostrados	33

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo geral.....	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. Materiais e Métodos	8
3.1. Coleta de parâmetros ambientais	8
3.2. Coleta de organismos	9
3.3. Preparação de extratos aquosos	10
3.4. Determinação da quantidade de proteína presente nos extratos.....	12
3.5. Avaliação da presença e atividade de proteases	12
3.6. Análise estatística	14
4. Resultados.....	16
4.1. Avaliação de parâmetros ambientais	16
4.2. Avaliação dos organismos	20
4.3. Determinação da expressão de proteínas	22
4.4. Avaliação da presença e atividade de proteases nos extratos	24
4.5. Avaliação da relação entre a expressão de proteínas e a atividade de proteases	27
4.6. Avaliação da relação entre os fatores oceanográficos e a atividade de proteases	29
5. Discussão	35
6. Referências bibliográficas.....	42
Anexo A. Comparação da expressão de proteínas de organismos coletados em 2016 em dois costões rochosos com extratos preparados em 2016 e 2019.....	52
Anexo B. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Expressão de proteínas para os 13 costões analisados	53
Anexo C. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Atividade enzimática sob o substrato Z-FR-AMC nos 13 costões analisados	54
Anexo D. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Atividade enzimática sob o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp nos 13 costões analisados	55
Anexo E. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Atividade enzimática sob o substrato Z-FR-AMC em 11 costões rochosos.....	56

1. Introdução

Mares e oceanos possuem uma diversidade filética que abrange a quase todos os grupos de seres vivos (Cordell, 2000). Além de realizarem processos essenciais para o planeta, tais como trocas gasosas, fotossíntese, absorção de carbono, os oceanos nos fornecem diversos recursos, sejam eles biotecnológico, econômicos ou culturais. Uma ideia mais simples de ecossistema consiste na interação dos organismos com fatores bióticos e abióticos. Estas interações podem definir padrões importantes como de distribuição, de comportamento, de reprodução, de alimentação e evolutivos (Davenport & Davenport, 2005; Rawlings, 1999; Rilov et al., 2005).

Dentre os ecossistemas marinhos estão os costões rochosos, os quais são ambientes dinâmicos, onde fatores oceanográficos como temperatura, salinidade e exposição às ondas variam diariamente com o ciclo das marés (Menge & Farrell, 1989). Essa variação é afetada pela geomorfologia do local, podendo ser classificados como expostos, abrigados ou intermediários (Flores et al., 2019; Ribeiro et al., 2019; Scrosati & Freeman, 2019). O grau de exposição simultaneamente com o dinamismo ambiental causa um padrão peculiar em costões rochosos, a zonação, onde os organismos se distribuem em gradientes de acordo com seus hábitos alimentares e comportamentais, adaptações e necessidades (Southward, 1958, McQuaid et al., 2000, Tomanek & Helmuth 2002). Diferenças no grau de exposição podem determinar também quais espécies habitam ali, sua abundância, como elas se relacionam entre si (Bertness et al., 2006, Nielsen et al., 2016). Além desses aspectos, o grau de exposição influencia a capacidade de armazenar biomassa; Bustamante (1997) demonstrou que em costões rochosos expostos a maior parte da biomassa se encontra concentrada no meso e no infralitoral, enquanto em costões rochosos abrigados, ela se concentra no infralitoral.

A concentração de nutrientes, assim como o grau de exposição às ondas e a circulação da água influenciam na estrutura de comunidades, servindo como fonte de energia para os produtores primários (Bustamante & Branch, 1996). A

concentração de Clorofila-a está relacionada com taxas de crescimento dos organismos e com as interações tróficas, uma vez que quanto mais fitoplâncton, mais alimento para os filtradores da cadeia trófica (Menge et al., 1997). A concentração de Clorofila-a está inversamente relacionada com a temperatura superficial da água e positivamente relacionada com a velocidade dos ventos e tamanho das ondas (Kotta and Kitsiou, 2019). A concentração de Clorofila-a está relacionada também com o fenômeno de ressurgência costeira, onde a ação de correntes marinhas e ventos as massas de água superficiais são substituídas por massa com maior concentração de nutrientes, possibilitando o crescimento de fitoplâncton (Ishizaka et al., 1983; Lehmann et al., 2001). Este fenômeno pode estar relacionado com fenômenos atmosféricos como o *El Niño* (Uloa et al., 2011). No Brasil, a ressurgência ocorre na região de Cabo Frio (RJ) (Valentin et al., 1987; Valentin, 2001). A quantidade de fitoplâncton opera um controle nas comunidades consumidoras em costões rochosos, onde são capazes de controlar, associados com a exposição às ondas, a biomassa de organismos filtradores (Bustamante et al., 1995; Menge et al., 1997).

Além de interagirem com o ambiente em que estão inseridas, diferentes espécies interagem entre si e realizam a regulação da dinâmica da comunidade de um costão rochoso. O controle desse pode ser *top-down*, por pressão de espécies predadoras, ou *bottom-up*, pela quantidade de nutrientes, onde os produtores primários controlam as populações dos consumidores (Bulleri et al., 2016). A presença de determinadas espécies pode ainda causar efeitos tanto nas outras espécies, como no próprio ambiente (McLaren & Peterson, 1994). O equilíbrio de um ecossistema pode ser mantido através da predação, da competição ou simplesmente da presença de uma espécie-chave no ambiente. A remoção de uma ou mais podem resultar no domínio de uma espécie sésil no substrato, aumento da população de predadores e a sensibilização de espécies predadas, ou seja, estas correm o risco de serem extintas (Mills et al., 1993; Navarrete & Menge, 1996).

Uma espécie-chave facilmente encontrada nos costões rochosos da costa brasileira é a *Stramonita brasiliensis* (Claremont et al., 2011), uma espécie carnívora de gastrópode que se alimenta de cracas, mexilhões e poliquetas (Dayton, 1971,

Hunt & Scheibling, 1998, Watanabe & Young, 2006). *Stramonita* apresenta o mesmo papel funcional do que gastrópodes do gênero *Nucella* no hemisfério norte, e podem ser encontrado na zona entremarés em locais abrigados ou expostos, porém são mais abundantes e ativos em locais protegidos das ondas (Burrows & Hughes 1990, Duarte & Guerrazzi, 2004; Hughes & Dunkin, 1984; Menge, 1978). Outro fator que afeta tanto a atividade de forrageamento quanto o tamanho desses organismos, é a espécie de suas presas que se encontram em maior abundância. Burrows & Hughes (1990) demonstraram que mesmo em locais mais expostos, os organismos se alimentaram e cresceram quando a comunidade de mexilhões era dominante. Para gastrópodes carnívoros, o tamanho do corpo e da concha são muito importantes na capacidade de forrageamento, pois apresentam relação com a quantidade de alimento e espécies das presas consumidas (Brown, 1997; Burrows and Hughes, 1990).

Esses gastrópodes possuem órgãos sensoriais que permitem que detectem sinais químicos na água para forragear (Hughes, 1986), uma vez que os sinais foram detectados, esses organismos conseguem predação mesmo que suas presas deixem de emitir traços químicos na água (Byron & Smee, 2012). Através da predação, a *S. brasiliensis* ajuda a manter o balanço na população de suas presas, e pode ainda competir com outras espécies consumidoras como outros gastrópodes e estrelas-do-mar (Hughes & Dunkin, 1984; Watanabe & Young, 2006). A *Stramonita brasiliensis* pode ainda atuar como agentes controles de bioinvasões, tendo preferência por consumir as espécies invasoras caso estas tenham maior valor energético (Giacoletti et al., 2016).

Além de seu papel ecológico, gastrópodes marinhos são usados para consumo humano, podendo ser cultivados ou coletados na natureza, apesar de não ser comum no Brasil, há registros de consumo dessa espécie na Baixada Santista (Munhoz et al., 2018), porém é mais comum em locais como Fiji e na Índia (Ab Lah et al., 2017; Cavalcante-Braga et al., 2006). Esses organismos são ricas fontes de elementos essenciais tais como zinco, ferro e selênio, aminoácidos essenciais, lipídios e vitaminas (Panayotova et al., 2019; Tang et al., 2016).

Estressores ambientais como exposição às ondas e dessecação são as

principais causas de morte de organismos em costões rochosos (Leigh et al., 1987; McQuaid & Branch, 1985). Estes fatores podem também causar mudanças fisiológicas nos organismos, por exemplo, estudos indicam que os organismos desenvolvem diferentes mecanismos quando estão submersos; seu metabolismo muda, assim como sua frequência cardíaca, temperatura corporal e expressão gênica (Bjelde & Todgham, 2013; Dong & Williams, 2011; Tomanek & Sanford, 2003).

Proteínas participam de diversos processos de regulação ao estresse ambiental, seja ele térmico, osmótico, anaeróbico e físico (Tomanek, 2010), e possuem diversas funções nos organismos. Entre elas, temos as proteases, que chegam a compor um total de 2% dentre as enzimas de um organismo e participam de processos relacionados ao crescimento e à sobrevivência de todos os seres vivos, por exemplo apoptose, processos digestivos, de defesa do sistema imunológico e coagulação sanguínea (Barrett & Rawlings, 2005; Klomklao, 2008). As proteases podem ser caracterizadas de acordo com seu mecanismo catalítico, onde são divididas em classes, sendo essas as serinoproteases, cisteinoproteases, aspartilproteases, metaloproteases, glutamilproteases, asparaginoproteases, treoninoproteases e as proteases de sítio catalítico misto ou desconhecido (Rawlings and Bateman, 2019).

As proteases de organismos marinhos possuem propriedades únicas, devido às adaptações de ambientes de condições adversas (Bakus et al., 1986), incluindo maior eficiência catalítica em baixa temperatura, estabilidade térmica e atividade sob condições severas, tais como temperaturas acima de 50°C, pH elevado, presença de surfactantes, agentes oxidantes e metais pesados (Costa et al., 2013; Díaz-López & García-Carreño 2000; Gildberg et al, 2000; Joo et al., 2001; Klomklao et al., 2005; Klomklao et al., 2006; Shamsuzzman & Haard 1985). Em gastrópodes marinhos, como a *S. brasiliensis*, proteases podem ser encontradas principalmente nas gônadas e nos músculos, onde participam de processos relacionados à reprodução e inanição alimentar (Homaei et al., 2016; Martin et al., 2011). As proteases estão associadas ao fortalecimento do sistema imunológico de camarões (Javahery et al., 2019; Liu et al., 2009); com a recuperação dos órgãos quando

peixes são expostos a baixas temperaturas (Sánchez-Nuño et al., 2019); à proteção mitocondrial contra mudanças rápidas no ambiente marinho, permitindo a realização de processos importantes em suas mitocôndrias, mesmo sob condições de estresse (Sokolova, 2018).

Além disso, as proteases constituem também um valioso recurso biotecnológico, representando quase 50% de todas as enzimas utilizadas na indústria, sendo aplicadas em diversos processos relacionados à indústria alimentícia, processos de limpeza, fabricação de detergentes e na indústria têxtil (Arunachalam & Saritha, 2009; Klomklao, 2008; Sumantha et al., 2006; Tavano, 2013; Turk, 2006). O Brasil possui uma extensa costa que conta com uma grande diversidade, esta constitui um grande valor ecológico e biotecnológico na prospecção de novos processos e produtos. Os organismos marinhos vêm se tornando uma fonte atrativa de biomoléculas devida à imensa diversidade quimicobiológica que apresentam. Dentro desse contexto, muitos produtos naturais derivados desses organismos já foram descritos, entre eles proteases e seus inibidores. Pouco é conhecido sobre o papel fisiológico que essas proteínas desempenham em organismos marinhos, mas muitas aplicações biotecnológicas para as proteases e seus inibidores têm sido descritas. Com isso, desde 2012 estamos trabalhando em uma linha de pesquisa de bioprospecção de organismos marinhos na UNIFESP *campus* Baixada Santista, onde temos extraído inibidores de serinoproteases e cisteinoproteases de algas e invertebrados marinhos. Nesses projetos, foram avaliadas diversas espécies de organismos marinhos e a presença desses inibidores foi mais pronunciada em espécies que apresentam plasticidade ecológica em relação aos parâmetros ambientais como dessecação, quantidade de alimento disponível, competição e predação (Gambarini, 2015). Sabendo da importância dos ecossistemas marinhos e dos impactos que o despejo de esgoto sem tratamento pode causar, em 2015 iniciou-se um outro projeto para fazer uma avaliação ecológica mais completa de áreas com e sem impacto antrópico. Nesse trabalho, fizemos um estudo comparativo entre praias impactadas e não impactadas da costa sudeste brasileira, onde foi avaliada a diferença da atividade das proteases e de seus inibidores em dois gastrópodes do entremarés rochoso, a *Stramonita brasiliensis* e a *Littorina flava*, um organismo pastador de costões rochosos

(Boulding & Van Alstyne, 1993). Os resultados demonstraram que não há relação entre a atividade de proteases e seus inibidores nas áreas impactadas, refutando nossa hipótese inicial de que ambientes mais impactados teriam proteases e inibidores de proteases mais ativos (Gesini, 2016). Embora nossa hipótese inicial tenha sido refutada, foi observada a presença e atividade de um inibidor de serinoproteases em *L. flava* e de uma metaloprotease em *S. brasiliensis* em todas as praias analisadas, com um padrão espacial visível nos costões rochosos analisados.

Assim, neste estudo buscamos integrar as áreas de bioquímica, oceanografia e ecologia para entender o papel de fatores oceanográficos, como exposição às ondas, temperatura superficial da água e produtividade primária na expressão de proteínas e na atividade de proteases no gastrópode marinho *Stramonita brasiliensis*. Este estudo constitui em mais um passo no entendimento de como a atividade de proteínas pode ser alterada devido às influências ambientais nos aspectos ecológicos dos organismos e também abre perspectivas para diversos estudos biotecnológicos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avançar no conhecimento de proteínas presentes no gastrópode *Stramonita brasiliensis* da costa sudeste brasileira e como essas se relacionam com fatores oceanográficos, analisando as relações das variáveis ambientais com a expressão de proteínas e a atividade de proteases nesse gastrópode.

2.2. Objetivos específicos

-Avaliar a expressão de proteínas e a atividade de proteases na *Stramonita brasiliensis*;

-Verificar o efeito da exposição às ondas, produtividade primária e temperatura superficial da água com a expressão de proteínas e a atividade de proteases.

3. Materiais e Métodos

Este trabalho consistiu em três estágios, onde primeiro foram avaliados parâmetros oceanográficos (Temperatura superficial da água, produtividade primária e grau de exposição às ondas) para 62 costões rochosos do litoral sul de São Paulo ao litoral norte do Rio de Janeiro, no período entre 2014 e 2015. O segundo estágio compreende o de amostragem do organismo avaliado (*Stramonita brasiliensis*) nos mesmos costões rochosos. O terceiro, foram as análises bioquímicas, realizadas em organismos de 13 costões rochosos, onde foi verificada a expressão total de proteínas e a atividade de proteases.

3.1. Coleta de parâmetros ambientais

Quanto às modelagens dos dados ambientais, foram utilizadas imagens via satélites disponibilizadas pelo banco de dados *NASA Ocean Biology Processing Group* (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>). Considerando que os fatores oceanográficos influenciam os parâmetros biológicos continuamente, consideramos o período de um ano anterior a data da coleta em cada costão rochoso para a obtenção da imagem, ou seja, para uma determinada área em que a coleta ocorreu em abril/2015, foram consideradas imagens de abril/2014 a março/2015. Estas análises foram realizadas pelo Doutorando André Pardal-Souza (FAPESP 2015/26859-3) correspondendo a uma base de dados comum para os projetos sob responsabilidade do orientador e maximizando os investimentos para obtenção e análises dos dados, os quais foram interpretados e cientificamente utilizados neste trabalho.

Temperatura superficial média e produtividade primária da água do mar

Neste trabalho, a produtividade primária foi considerada como a concentração média de clorofila-a na superfície do mar. Considerando-se que a influência da Temperatura Superficial Média da Água (TSM) e da produção primária costeira sobre as comunidades bentônicas é, geralmente, resultado de processos

que ocorrem em grandes escalas temporais, não há interesse, neste momento, na variação temporal em escalas pequenas. Data Modis foi extraído pelo software SeaDas (versão 7.4), no qual um pixel central disposto em uma janela (5x5 para produtividade primária e também em 9x9 para TSM) representa cada costão rochoso analisado. Assim, uma imagem composta foi usada para calcular cada variável que mescla todas as imagens compostas mensais de um ano. Considerando a colinearidade entre a produtividade primária e a TSM, os dados de TSM foram categorizados para as análises, sendo considerados mais quentes ($\geq 25^{\circ}\text{C}$) ou mais frios ($< 25^{\circ}\text{C}$).

Exposição às ondas

O grau de exposição às ondas dos costões rochosos foi determinado com base no modelo de Burrows *et al.* (2008). Esse método consiste na utilização de um *software* GIS (*Geographic Information System*) com as imagens de satélite, no qual são aplicados vetores a datasets de mapas gradeados de cada praia, contendo a parte terrestre até o alcance máximo das ondas formadas por ventos (alcance máximo). Para calcular o índice de exposição às ondas de cada célula do mapa, foi necessário calcular primeiro a média do *wave fetch* (efeito dos ventos na formação de ondas), e também a energia eólica, a qual foi encontrada pelo tempo proporcional em que o vento atuou em determinado setor, multiplicado pelo quadrado da média da velocidade do vento naquele setor. Por fim, o grau de exposição foi encontrado a partir do produto entre do *wave fetch* pela energia eólica para cada setor (mais detalhes em Burrows et al., 2008). Neste trabalho os dados de costões rochosos foram transformados em logaritmos, onde foram considerados costões expostos (≥ 4), intermediários (entre 3.5 e 3.7) e abrigados (≤ 3).

3.2. Coleta de organismos

As amostragens deste projeto estão vinculadas a outros estudos em andamento sobre os aspectos ecológicos de organismos de costões rochosos e sua

relação com os fatores oceanográficos pelo grupo de pesquisa do orientador (AP FAPESP 2016/24551-4; DR FAPESP 2015/26859-3). Nesses estudos, 62 costões rochosos do norte do Rio de Janeiro até o sul de São Paulo foram amostrados aleatoriamente. As amostragens foram realizadas na zona entremarés, durante períodos de maré baixa. Os costões rochosos são separados por, pelo menos, uma praia arenosa e por 1 Km de distância, para garantir a independência entre eles. Estas amostragens foram realizadas de abril a setembro de 2015, levando-se em conta os efeitos da sazonalidade nos organismos, assim foram feitas coletas em ordem interespaçial e misturada de maneira que a diferença temporal fosse minimizada para os 62 costões rochosos. Durante as coletas verificou-se a ausência de cápsulas reprodutivas de *S. brasiliensis*, o que indica que diferenças fisiológicas por conta de reprodução não interferiram nos resultados. Em cada costão rochoso, indivíduos de *S. brasiliensis* foram coletados em maré baixa, aleatoriamente no entremarés, independente do tamanho e foram armazenados em gelo durante o transporte e eutanaziados por choque térmico. Por fim os organismos foram congelados em *freezers* até o momento das análises bioquímicas.

3.3. Preparação de extratos aquosos

Os 62 costões coletados foram avaliados quanto a quantidade de organismos de *Stramonita brasiliensis* disponíveis, tamanho da concha e a massa úmida dos organismos. Assim, considerando-se a experiência prévia da biomassa necessária para extração de proteínas (Gesini, 2016) foram selecionados organismos de 13 costões cuja preparação de extratos aquosos era viável (**Figura 1**). A medida do comprimento da concha (canal sifonal-vértice) foi determinada através de um paquímetro analógico 0-150 mm e a das massas úmidas com e sem a concha em uma balança de alta precisão.

Para esta etapa foi determinado um intervalo entre 0,8 a 1,2 g de massa úmida de organismo sem a concha, para que os organismos possuíssem maturidades semelhantes, dado que organismos adultos tendem a apresentar maior massa. Para cada um dos costões foram selecionados 5 indivíduos de *Stramonita*

brasiliensis, denominados de réplicas. Estas foram fatiadas, e em um homogeneizador de tecidos foram homogeneizadas individualmente em água destilada em proporção 1:2 (massa:volume). Os homogenatos resultante foram centrifugados a 10.000xg por 20 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes foram nomeados extratos.

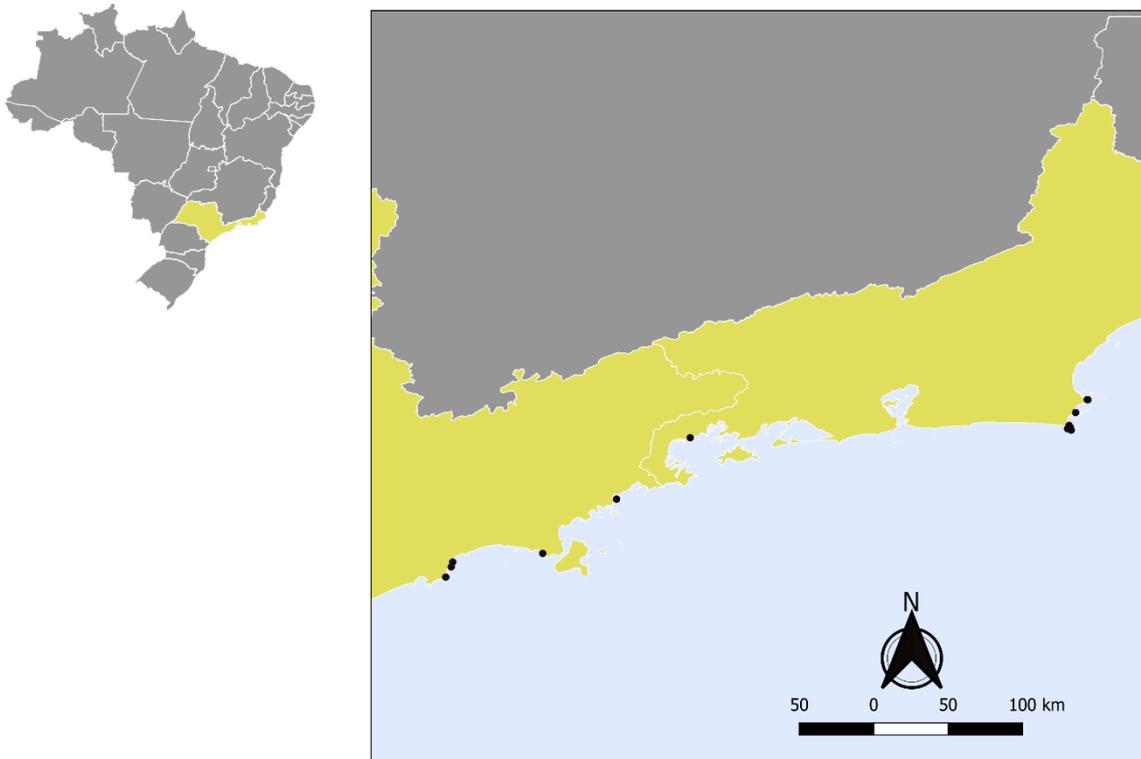


Figura 1. Distribuição dos locais amostrados do litoral sul de São Paulo ao litoral norte do Rio de Janeiro.

3.4. Determinação da quantidade de proteína presente nos extratos

Baseando-se no método de Bradford (1976), para a quantificação de proteínas totais das amostras, foi utilizado o reagente BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories, CA, EUA), segundo as instruções do fabricante. Este ensaio foi feito em microplaca, onde triplicatas das réplicas (10 µL) de cada costão rochoso foram incubadas com 200 µL do reagente diluído em água ultra pura (1:4) em temperatura ambiente por 20 minutos; logo após foi lida a absorbância em 595 nm. Foi usada como padrão (12,5 µg/mL a 500 µg/mL) albumina de soro bovino (BSA, em inglês *Bovine Serum Albumin*). Após a determinação, foi feita uma relação entre a quantidade de proteínas totais presentes nos extratos (mg) com a quantidade de massa total dos organismos (g). Essa razão foi denominada de expressão de proteínas. Além disso, baseado nos dados anteriores de expressão de proteínas, também foi calculado o teor proteico dos organismos, dado em g de proteína/100 g de organismo ou g%.

Para verificar se houve degradação de proteínas ao longo do tempo de congelamento, comparou-se a quantidade de proteínas em organismos coletados em 2016 com extratos preparados no mesmo ano (Gesini, 2016), com organismos coletados em 2016 e congelados até 2019. A metodologia usada foi a mesma descrita acima e não houve diferença estatística entre as amostras (**Anexo A**)

3.5. Avaliação da presença e atividade de proteases

A presença das proteases nos extratos foi verificada pela capacidade dos extratos hidrolisarem os substratos fluorogênicos Z-FR-AMC (Merck, Darmstadt, Alemanha), um substrato geral para proteases, e Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (sintetizado e cedido pelo Departamento de Biofísica, UNIFESP, *campus* São Paulo), que se trata de um substrato mais específico para metaloproteases presentes em *Stramonita brasiliensis* (Gesini, 2016).

Para o substrato Z-FR-AMC, as réplicas foram analisadas em duplicatas (contendo 10 e 20 µg de proteína) e foram pré-aquecidas em tampão Tris 50 mM, NaCl 30 mM, pH 8,0, durante 2 minutos a 37 °C. Após esse período de incubação,

adicionou-se o substrato (em concentração de 20 μM), atingindo um volume final de 200 μL . A atividade enzimática foi avaliada na hidrólise do substrato, medindo-se a fluorescência a $\lambda_{\text{exc}}=380\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=460\text{ nm}$, durante 20 minutos a 37 °C, em uma leitora de placas. Após a medida da velocidade da reação (UAF/min), foi calculada a atividade enzimática específica (AEE), definida como UAF/min por micrograma de proteína. Cada costão rochoso corresponde ao valor da média \pm desvio padrão de pelo menos 20 valores de AEE para o substrato Z-FR-AMC.

Devido a limitação da quantidade de inibidores foi selecionado apenas um costão rochoso para a determinação das classes de proteases presentes nos extratos. As réplicas do costão de Iporanga (contendo 20 μg de proteína) foram escolhidas por apresentarem alta atividade enzimática e pouca variação entre a atividade enzimática das réplicas. Elas foram pré-incubadas com os inibidores clássicos (**Tabela 1**) em tampão Tris 50 mM, NaCl 30 mM, pH 8,0, durante 10 min a 37°C. Após esse período, foi adicionado o substrato Z-FR-AMC (20 μM), atingindo-se um volume final de 200 μL . A atividade enzimática foi avaliada na hidrólise do substrato fluorogênico, medindo-se a fluorescência a $\lambda_{\text{exc}}=380\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=460\text{ nm}$, durante 10 min a 37 °C, em leitora de placas (Hitachi F-7000, Tokio, Japão).

A inibição das proteases foi medida por sua atividade residual e expressa em relação à velocidade de hidrólise do substrato na ausência do inibidor (100%). A porcentagem de atividade inibitória foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Atividade Inibitória} = 100 - \% \text{ Atividade Residual}$$

O substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp, por sua vez seguiu um processo semelhante ao anterior. As réplicas (contendo 10 e 20 μg de proteína) foram pré-aquecidas em tampão Tris 50 mM, NaCl 30 mM, pH 8,0, durante 2 min a 37°C. Após esse período, foi adicionado o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (em concentração de 20 μM), atingindo-se um volume final de 200 μL . A atividade enzimática foi avaliada na hidrólise do substrato fluorogênico, medindo-se a fluorescência a $\lambda_{\text{exc}}=320\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=420\text{ nm}$, durante 10 min a 37 °C, em leitora de placas (Hitachi F-7000, Tokio, Japão). Após a medida da velocidade da reação (UAF/min), foi calculada a atividade enzimática específica (AEE), definida como UAF/min por micrograma de proteína. Cada costão rochoso corresponde ao valor da

média \pm desvio padrão de pelo menos 20 valores de AEE para o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp.

Tabela 1. Inibidores de proteases utilizados e suas respectivas classes inibidas

Inibidor de protease	Classe inibida	Concentração final
Aprotinina	Serinoprotease	0,3 μ M
Ácido etileno diamino tetracético (EDTA)	Metaloprotease	4 mM
Lisinopril	Metaloexoprotease	10 μ M
Pepstatina-A	Aspartilprotease	10 μ g/ml
L-transepoxisuccinilleucilamido-[4-guanidino]butano (E64)	Cisteinoprotease	5 μ M

3.6. Análise estatística

A seleção do melhor modelo preditivo indicando o efeito das diferentes variáveis ambientais na concentração das proteínas/enzimas envolveu diversos passos (Zuur et al., 2009). Modelos candidatos foram ajustados através de 'generalised least squares' (R software, pacote 'nlme') (método: *maximum likelihood*). Quando necessário, variáveis repostas foram transformadas com o intuito de melhorar a distribuição dos dados. Os modelos incluíram a interação de segunda ordem (Ch1a*exp*tsm), todas as interações de primeira ordem e efeitos individuais de cada preditor. O modelo com menor AICc (*Akaike Criterion Information* corrigido pelo tamanho amostral) foi selecionado. Durante o processo de validação dos modelos (visualização de gráficos dos valores ajustados pelos resíduos, resíduos

vs. cada preditor e *qqplot*) foi confirmada a existência de padrões nos resíduos, indicando variância desigual. Portanto, esse primeiro melhor modelo foi comparado com modelos que explicitamente levam em consideração heterocedasticidade associada aos fatores em teste. Modelos sem e com diferentes estruturas de variância foram ajustados através de REML (*restricted maximum likelihood*) e comparados através de valores AICc e testes LR (*likelihood test*). Modelos com menor AICc e que estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) foram selecionados. Em todos os casos a inclusão de estrutura de variância melhorou os modelos. Valores preditos pelos modelos foram obtidos através do pacote '*ggeffect*'. Gráficos para visualização dos resultados foram feitos nos pacotes '*ggplot*' ou '*lattice*'. No caso de dados extremos para atividade enzimática de proteases, optou-se por usar os dados que apresentaram resultados em um mesmo nível, para verificar qual seria a resposta, assim para o substrato Z-FR-AMC, decidimos refazer a análise com apenas 11 costões rochosos.

4. Resultados

4.1. Avaliação de parâmetros ambientais

No litoral de São Paulo, a temperatura média da água do mar variou entre 24,5 °C e 26 °C, enquanto para a costa do Rio de Janeiro, há um decréscimo para 23 °C até a região dos lagos (**Figura 2, Tabela 2**). Para clorofila-a (Chl-a), houve um gradiente decrescente na costa de São Paulo, no sentido sul-norte. Para o Rio de Janeiro, não há padrão linear, têm-se um pico na região da baía de Guanabara, seguido por um decaimento até a região dos Lagos (**Figura 3, Tabela 2**). Para exposição as ondas não houve uma variação latitudinal, sendo que o índice de exposição variou dentro de cada localidade (**Tabela 2**).

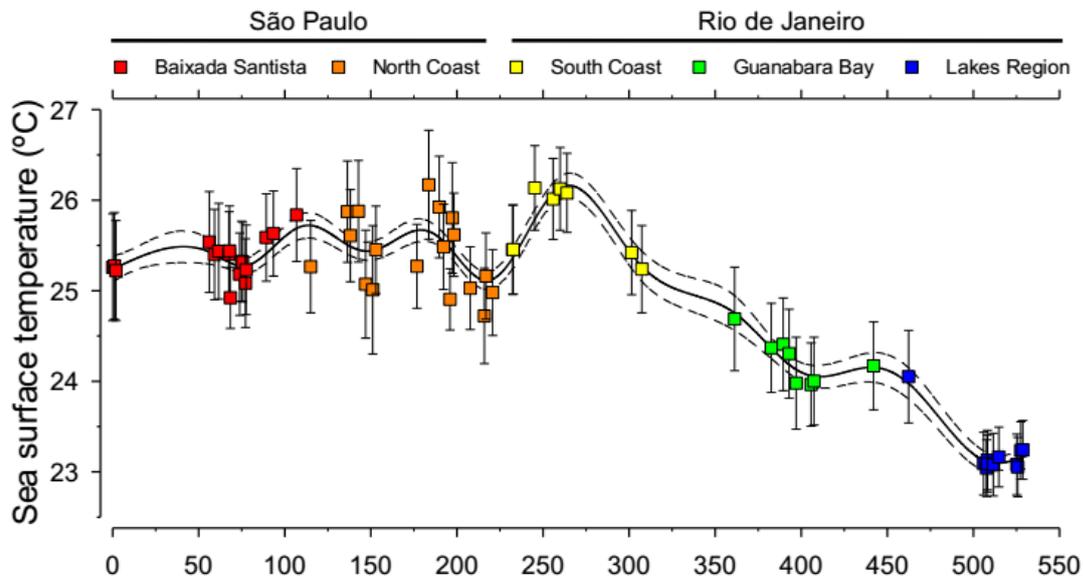


Figura 2. Temperatura superficial média de águas próximas à costa.

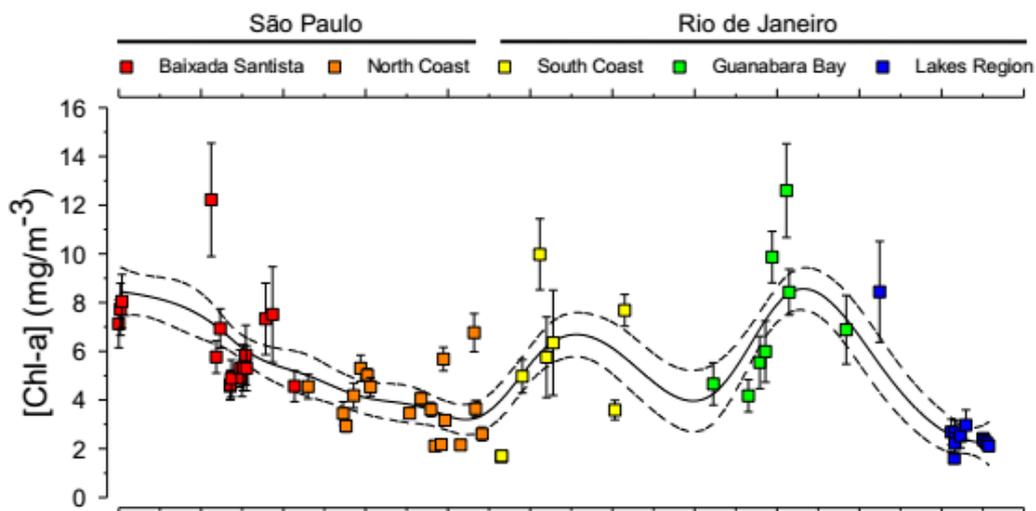


Figura 3. Concentração de clorofila-a na superfície da água ao longo da costa sudeste brasileira.

Foram obtidos valores numéricos para as três variáveis ambientais consideradas neste trabalho: grau de exposição às ondas, produtividade primária (Chl-a) e temperatura superficial média das águas (TSM) para os 13 costões amostrados (**Tabela 2**).

Tabela 2. Valores apresentados como média \pm desvio padrão para os fatores oceanográficos exposição às ondas, clorofila-a (Chl-a) e temperatura superficial média da água (TSM) para os 13 costões rochosos amostrados neste trabalho.

Costão rochoso	Região	Exposição às ondas	Chl-a (mg/m³)	TSM (°C)	
Pernambuco	Guarujá - SP	8821,44 \pm 2598,87	4,88 \pm 4,20	25,67 \pm 2,95	Quente
Iporanga	Guarujá - SP	11154,05 \pm 2262,01	4,89 \pm 4,24	25,35 \pm 2,56	Quente
Branca	Guarujá - SP	10348,84 \pm 1299,63	5,30 \pm 5,06	25,56 \pm 2,61	Quente
Toque Toque Pequeno	São Sebastião - SP	5332,51 \pm 1376,08	4,34 \pm 2,86	26,00 \pm 2,91	Quente
Itaguá	Ubatuba - SP	2880,08 \pm 1461,01	4,56 \pm 4,38	26,00 \pm 3,11	Quente
Coqueiros	Paraty - RJ	5467,97 \pm 508,22	6,35 \pm 13,67	25,79 \pm 2,84	Quente
Ponta da Cabeça	Arraial do Cabo - RJ	8823,00 \pm 2552,63	2,68 \pm 3,65	23,78 \pm 2,27	Frio
Prainha	Arraial do Cabo - RJ	2861,73 \pm 1422,51	1,61 \pm 1,47	22,88 \pm 1,73	Frio
Atalaia	Arraial do Cabo - RJ	2467,27 \pm 785,85	2,67 \pm 3,61	21,07	Frio
Forno	Arraial do Cabo - RJ	2434,59 \pm 1186,60	2,21 \pm 2,98	22,95 \pm 2,01	Frio
Conchas	Cabo Frio - RJ	9191,49 \pm 1907,48	2,97 \pm 4,42	22,56 \pm 1,46	Frio
Geribá	Búzios - RJ	8374,11 \pm 2296,97	2,42 \pm 1,30	22,68 \pm 1,64	Frio
Ferradurinha	Búzios - RJ	9083,80 \pm 1804,45	2,34 \pm 1,32	22,96 \pm 1,74	Frio

4.2. Avaliação dos organismos

Os organismos apresentaram variação de biomassa de 0,86 a 1,16 g (diferença de 1,4 vezes). Apesar de o intervalo escolhido variar em 0,4 g, as massas com as conchas variaram de 3,35 a 6,75 g (diferença de 2 vezes), e os tamanhos médios dos organismos escolhidos variaram de 25,58 a 30,10 mm (1,2 vezes) (**Tabela 3**). Isso mostra que para esses organismos não houve uma relação direta entre o tamanho e/ou a massa com a concha com a massa sem a concha. Como exemplo, temos os organismos coletados no costão de Atalaia, com a maior média de massa com a concha e a segunda maior média de tamanho, mas que não foi o mais pesado sem a concha. Ou ainda os organismos coletados no costão da Praia de Ponta da Cabeça, que apresentaram a menor média do tamanho da concha, porém sem a concha apresentaram a maior massa.

Tabela 3. Valores (média ± desvio padrão) para o tamanho, massa dos organismos com a concha, massa dos organismos sem a concha e volume dos extratos das 5 réplicas dos extratos aquosos de *Stramonita brasiliensis*.

Costão rochoso	n	Tamanho (mm)	Massa com a concha (g)	Massa sem a concha (g)	Volume do extrato (ml)
Pernambuco	5	28,06 ± 1,86	6,21 ± 0,66	1,03 ± 0,14	2,07 ± 0,29
Iporanga	5	28,32 ± 1,72	5,12 ± 0,35	0,86 ± 0,06	1,73 ± 0,13
Branca	5	26,64 ± 1,05	4,80 ± 0,29	1,01 ± 0,14	2,02 ± 0,28
Toque-Toque Pequeno	5	27,66 ± 1,20	4,73 ± 0,86	0,83 ± 0,17	1,67 ± 0,35
Itaguá	5	25,58 ± 0,43	4,49 ± 0,59	0,98 ± 0,15	1,97 ± 0,30
Coqueiros	5	26,28 ± 2,54	4,72 ± 0,38	0,99 ± 0,19	1,98 ± 0,38
Ponta da Cabeça	5	25,26 ± 0,67	3,35 ± 0,42	1,16 ± 0,11	2,32 ± 0,21
Prainha	5	26,30 ± 2,10	3,95 ± 1,18	0,99 ± 0,18	1,98 ± 0,35
Atalaia	5	30,04 ± 0,85	6,75 ± 0,82	1,06 ± 0,15	2,12 ± 0,31
Praia do Forno	5	30,10 ± 2,20	5,90 ± 1,40	1,07 ± 0,14	0,98 ± 0,20
Praia das Conchas	5	29,36 ± 1,16	4,76 ± 0,65	1,08 ± 0,15	2,14 ± 0,31
Geribá	5	30,04 ± 2,08	5,59 ± 1,24	1,04 ± 0,15	2,08 ± 0,30
Ferradurinha	5	27,50 ± 1,24	3,85 ± 1,03	1,08 ± 0,09	2,16 ± 0,18

4.3. Determinação da expressão de proteínas

A expressão de proteínas variou até 13 vezes entre os organismos dos costões rochosos. A variação foi menor entre os organismos coletados em São Paulo (2,8 vezes) do que entre os organismos coletados no Rio de Janeiro (10 vezes). A maior expressão de proteínas foi encontrada nos organismos do costão rochoso de Itaguá ($57,51 \pm 19,83$ mg de proteína/g de organismo) no litoral norte de São Paulo. Por sua vez, os organismos do costão rochoso com menor expressão de proteínas foi o de Prainha em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro ($4,31 \pm 4,11$ mg de proteína/g de organismo). O teor proteico nos organismos variou entre 0,4-5,8 g/100 g (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores (média ± desvio padrão) para a expressão de proteínas e o teor de proteínas (g/100 g ou %) nos extratos de *Stramonita brasiliensis* .

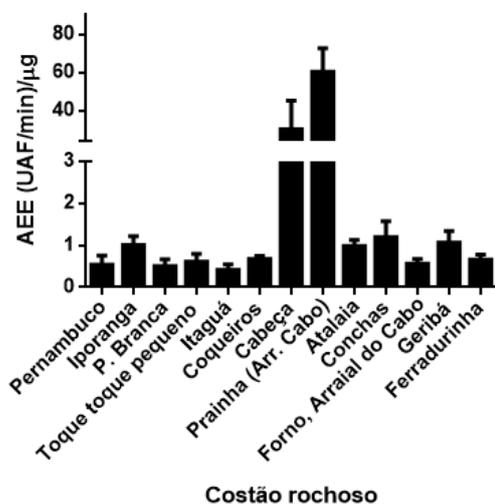
Costão rochoso	Região	Expressão de proteínas (mg proteína/g organismo)	Teor médio de proteínas (g/100 g ou %)
Pernambuco	Guarujá -SP	39,20 ± 2,71	3,9 ± 0,3
Iporanga	Guarujá -SP	20,41 ± 4,9	2,0 ± 0,5
Branca	Guarujá -SP	38,74 ± 6,24	3,9 ± 0,6
Toque-Toque Pequeno	São Sebastião - SP	27,94 ± 8,97	2,8 ± 0,9
Itaguá	Ubatuba - SP	57,51 ± 19,82	5,8 ± 2,0
Coqueiros	Paraty - RJ	13,82 ± 7,87	1,4 ± 0,8
Ponta da Cabeça	Arraial do Cabo - RJ	5,74 ± 7,37	0,6 ± 0,7
Prainha	Arraial do Cabo - RJ	4,31 ± 4,11	0,4 ± 0,4
Atalaia	Arraial do Cabo - RJ	44,56 ± 19,42	4,5 ± 1,9
Forno	Arraial do Cabo - RJ	42,42 ± 2,42	4,2 ± 0,2
Conchas	Cabo Frio - RJ	36,44 ± 2,31	3,6 ± 0,2
Geribá	Búzios - RJ	23,13 ± 18,85	2,3 ± 1,9
Ferradurinha	Búzios - RJ	41,96 ± 1,04	4,2 ± 0,1

4.4. Avaliação da presença e atividade de proteases nos extratos

Para o substrato Z-FR-AMC, todos os organismos dos costões avaliados hidrolisaram esse substrato com atividade enzimática específica (AEE) variando de uma média de 0,415 a 60,257 (UAF/min)/ μg , respectivamente nos costões de Itaguá e de Prainha, uma diferença de quase 150 vezes (**Figura 4A**). Dos 13 costões rochosos analisados, 11 tiveram atividade enzimática abaixo de 2 (UAF/min)/ μg , enquanto outros 2 costões rochosos atividades acima de 35 (UAF/min)/ μg . Como o Z-FR-AMC é um substrato geral para proteases, inibidores clássicos foram usados para determinar quais classes de proteases estavam envolvidas na sua hidrólise. As maiores atividades inibitórias foram observadas para Aprotinina e EDTA, indicando principalmente a presença de serinoproteases seguida de metaloproteases, mas não foi descartada a presença de aspartilproteases e cisteinoproteases também hidrolisando esse substrato (**Figura 5**).

O substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp é um substrato mais específico para as metaloproteases presentes em *Stramonita brasiliensis* (Gesini, 2016). Todos os organismos dos costões avaliados hidrolisaram esse substrato com uma diferença de até 6,1 vezes entre os costões. As maiores médias de atividades foram observadas em Prainha – 1,330 (UAF/min)/ μg , Ponta Cabeça – 0,950 (UAF/min)/ μg , Geribá 0,949 (UAF/min)/ μg e Coqueiros - 0,831 (UAF/min)/ μg , e a menor média de atividade também foi no costão de Itaguá 0,217 (UAF/min)/ μg (**Figura 4B**).

A) Substrato Z-FR-AMC



B) Substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp

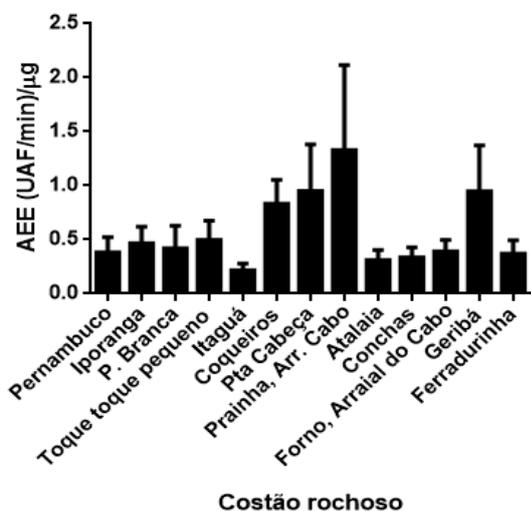


Figura 4. Atividade enzimática específica (AEE) de proteases (média \pm desvio padrão) do substrato Z-FR-AMC (A) e do substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (B) nos 13 costões amostrados.

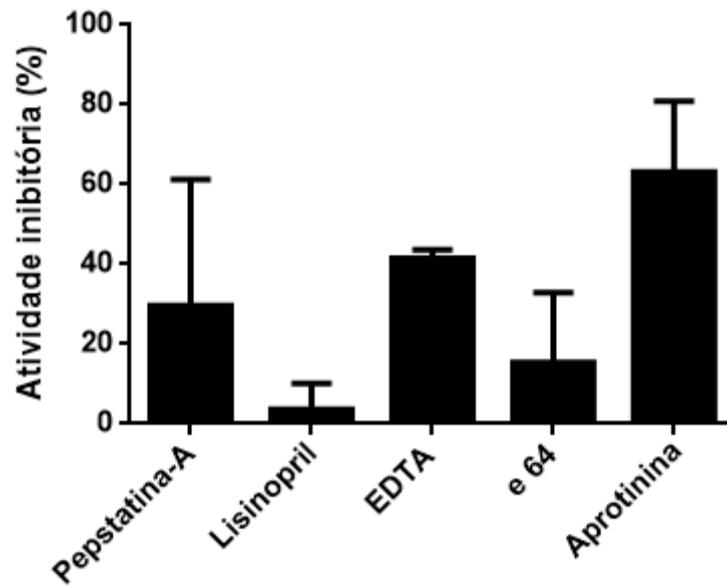
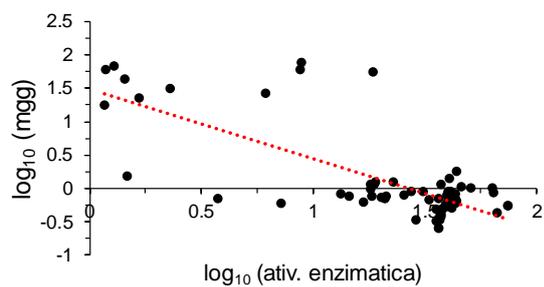


Figura 5. Determinação das classes de proteases envolvidas na hidrólise do substrato Z-FR-AMC (média \pm desvio padrão).

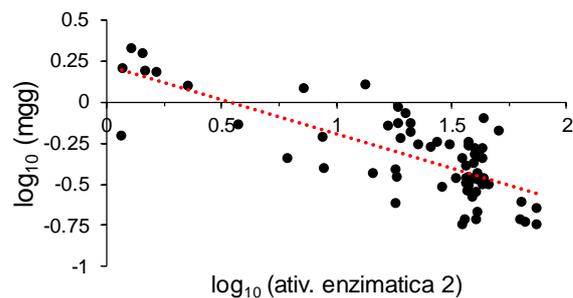
4.5. Avaliação da relação entre a expressão de proteínas e a atividade de proteases

Houve uma correlação negativa entre a expressão de proteínas nos organismos e a atividade enzimática, tanto para o substrato Z-FR-AMC (**Figura 6A**), como para o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (**Figura 6B**), indicando que quanto maior o conteúdo proteico dos organismos, menor a atividade de proteases. Com relação à comparação entre a hidrólise dos dois substratos, foi verificada uma correlação positiva entre a atividade para proteases em geral e para a atividade de metaloproteases (**Figura 6C**).

A) Substrato Z-FR-AMC



B) Substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp



C) Substrato Z-FR-AMC X Substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp

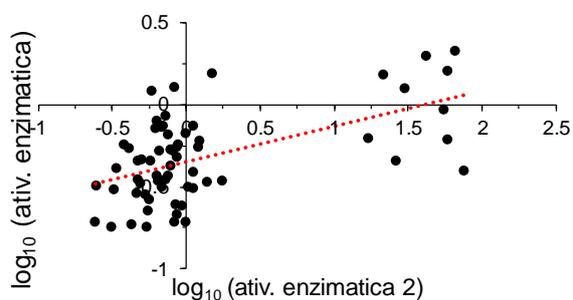


Figura 6. Correlação de Pearson entre a expressão de proteínas e as atividades enzimáticas. A) expressão de proteínas (mgg) x Atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC ($r = -0,73$); B) expressão de proteínas (mgg) x Atividade enzimática sobre o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp ($r = -0,75$) e C) Atividade enzimática sobre Z-Phe-Arg-AMC x Atividade enzimática sobre Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp ($r = 0,55$)

4.6. Avaliação da relação entre os fatores oceanográficos e a atividade de proteases

A expressão de proteínas (mgg) foi influenciada pela interação entre temperatura superficial do mar, concentração de Chl-a e grau de exposição as ondas (**Figura 7A e Tabela 5**). Nos costões rochosos com TSM quente, com o aumento das concentrações de Chl-a, a expressão de proteínas (mgg) aumenta em costões mais expostos e diminui em costões abrigados e intermediários. Por outro lado, em costões rochosos com TSM fria, com o aumento da temperatura a expressão de proteínas aumentou em todos os níveis de exposição as ondas. Quando a TSM é quente, as maiores expressões de proteínas são observadas em costões rochosos menos expostos as ondas e com menores concentrações de Chl-a assim como em costões rochosos mais expostos as ondas e com maiores concentrações de Chl-a. Por outro lado, as menores expressões de proteínas são observadas em organismos de costões rochosos quando valores de Chl-a e exposição as ondas são de extremos opostos, ou seja, naqueles mais expostos as ondas e com menores concentrações de Chl-a ou naqueles menos expostos as ondas e com maiores concentrações de Chl-a. Quando a TSM é fria, o grau de exposição as ondas está inversamente relacionado com mgg enquanto a produtividade primária está positivamente correlacionada, assim a maior expressão de proteínas (mgg) é observada em organismos de costões rochosos menos expostos e com maiores concentrações de Chl-a.

Para a atividade de proteases em geral, as variações foram mais evidentes em costões com temperaturas frias (**Figura 7B, Tabela 5**). Para o substrato Z-FR-AMC, foi encontrada interação entre os fatores Chl-a, exposição às ondas e TSM ($p < 0.0001$) (**Figura 7B**). Nos costões rochosos com TSM quente, a variação da atividade enzimática em relação a exposição as ondas foi similar, enquanto quando a TSM foi fria, os organismos apresentaram atividade de proteases muito maiores. Além disso, temos um claro efeito na atividade enzimática em função da exposição as ondas ao longo do aumento da concentração de Chl-a. Em costões expostos a atividade de proteases nos organismos aumentou com o aumento das concentrações de Chl-a, enquanto em costões rochosos intermediários e,

principalmente, nos abrigados, houve uma forte queda da atividade enzimática. Em áreas com TSM fria, o ótimo da atividade de proteases foi encontrado em extremos ambientais com baixas exposições e baixas concentrações de Chl-a e em costões mais expostos com altas concentrações de Chl-a.

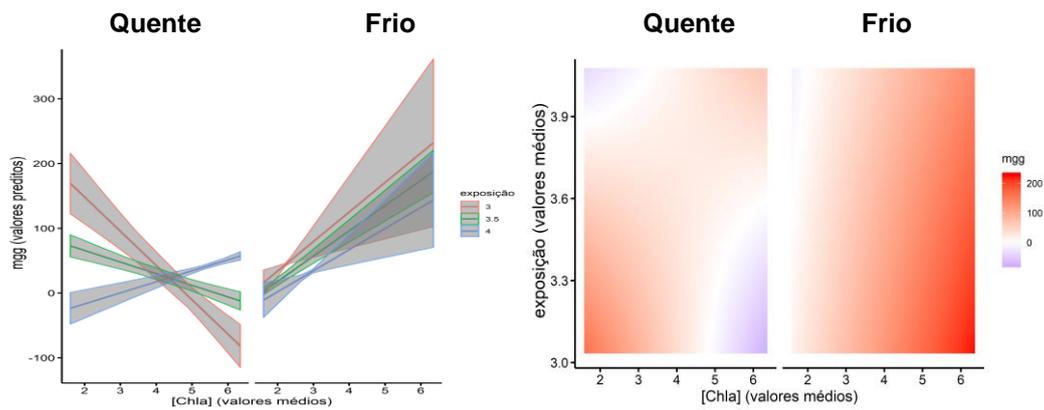
Para a atividade enzimática do substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp, não houve interação tripla entre todos os fatores, sendo que todas as interações duplas entre os fatores ambientais explicaram a variabilidade dos dados. Com o aumento de Chl-a, costões rochosos das diferentes categorias de TSM apresentaram respostas opostas, enquanto nos costões rochosos frios a atividade de metaloproteases dos organismos diminuiu, em áreas quentes a atividade de metaloproteases aumentou. Um padrão similar entre áreas de diferentes TSM foi observado em relação ao aumento da exposição as ondas: uma diminuição da atividade de metaloproteases dos organismos em áreas frias e um aumento em áreas quentes. Por fim, dentro das categorias de exposição as ondas, houve uma influência da produtividade primária. Em áreas abrigadas, a atividade enzimática aumentou com o aumento da Chl-a, enquanto um padrão oposto foi observado em áreas expostas. Para costões rochosos intermediários em relação a exposição as ondas, não houve variação em relação a produtividade primária (**Figura 7 e Tabela 5**).

Tabela 5. Sumário das interações obtidas pelo modelo GLM para os fatores clorofila a (Chl-a), grau de exposição às ondas (Exp), temperatura superficial média da água (TSM) e a expressão de proteínas (MGG), a atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC (ZFR) e a atividade no substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (ABZ) nos 13 costões amostrados

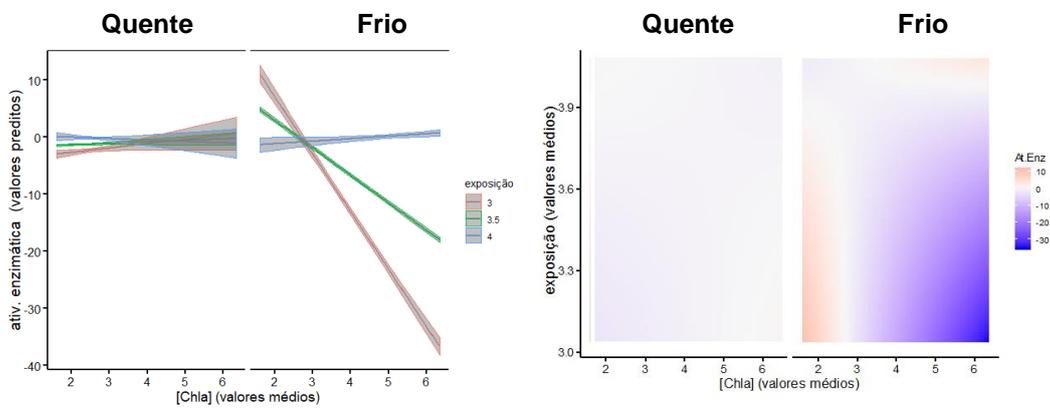
	MGG				ZFR				ABZ			
	Value	SD	t	p	Value	SD	t	p	Value	SD	t	p
R²	-38.6	232.7	-0.2	0.8686	115.1	6.1	18.7	**	-27.43	5.58	-4.91	**
Chl-a	84.5	95.2	0.9	0.3783	-41.6	2.3	-17.7	**	6.35	1.36	4.66	**
Exp	-6.1	65.7	-0.1	0.9256	-29.3	1.7	-16.8	**	7.05	1.54	4.56	**
TSM	1209.0	297.5	4.1	**	-133.3	9.6	-13.8	**	30.80	11.54	2.66	0.0100
Chl-a X Exp	-12.9	26.4	-0.5	0.6251	10.5	0.6	15.8	**	-1.67	0.36	-4.53	**
Chl-a X TSM	-	102.8	-	**	45.4	2.9	15.5	**	-9.48	4.37	-2.16	0.0344
Exp X TSM	-	82.7	-	**	33.9	2.7	12.5	**	-7.56	3.25	-2.32	0.0238
Chl-a X TSM X Exp	83.0	28.4	2.9	**	-11.5	0.8	-14.0	**	2.28	1.22	1.87	0.0666
GL					65 graus de liberdade				64 graus de liberdade			

** : $P < 0.0001$

A) Variáveis ambientais X mgg



B) Variáveis ambientais X atividade enzimática sob o substrato Z-FR-AMC



C) Variáveis ambientais X atividade enzimática do substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp

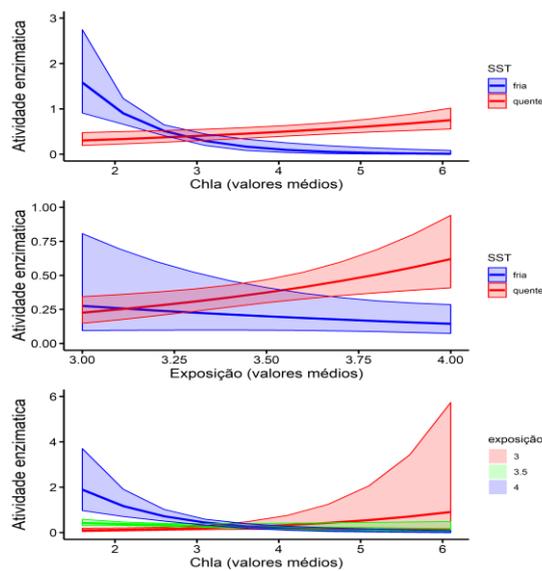


Figura 7. Interações entre os fatores oceanográficos e a expressão de

proteínas (mgg), atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC e com o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp nos 13 costões amostrados.

Considerando que 11 dos costões rochosos tiveram atividade enzimática para Z-FR-AMC abaixo de 2 (UAF/min)/ μ g, enquanto 2 costões rochosos tiveram atividade acima de 35 (UAF/min)/ μ g, avaliamos um segundo modelo com a retirada destes 2 com expressões mais altas para entender a influência dos fatores ambientais dentre aqueles de expressão com mesma magnitude.

Com a retirada dos costões rochosos da Ponta cabeça e Prainha, obteve-se um modelo mais simples, onde apenas a TSM e o grau de exposição às ondas explicam os dados. Para costões mais quentes, a atividade de proteases sobre Z-FR-AMC nos organismos aumentou com o aumento do grau de exposição e, para os costões mais frios, a atividade de proteases nos organismos diminuiu com o aumento do grau de exposição (**Figura 8 e Tabela 6**).

Tabela 6. Sumário das interações obtidas pelo modelo GLM para os fatores clorofila a (Chl-a), grau de exposição às ondas, temperatura superficial média da água (TSM) e a atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC nos 11 costões amostrados

	Value	SD	t	p
R ²	2.0	0.6	3.09	0.0032
Log Exposição	-0.6	0.1	-3.34	0.0016
TSM	-5.1	1.0	-4.71	**
Exposição x TSM	1.3	0.3	4.38	0.0001

****:** $P < 0.0001$

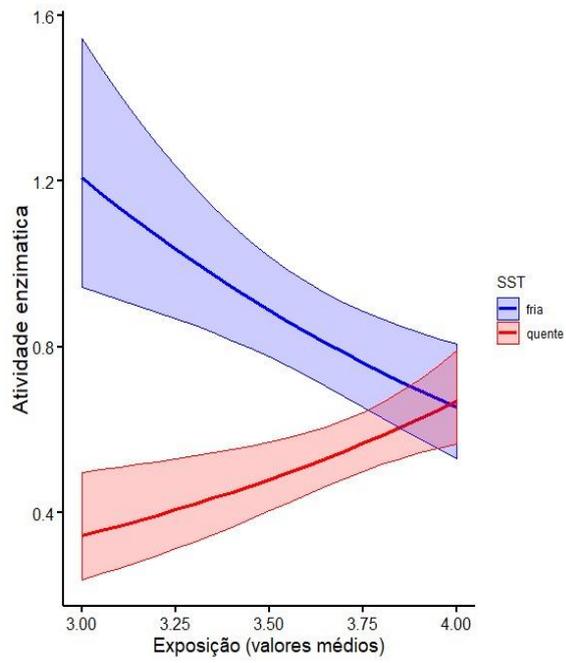


Figura 8. Interações entre os fatores oceanográficos e a atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-AMC em 11 costões amostrados.

5. Discussão

Nosso estudo demonstra uma forte relação entre fatores oceanográficos e a expressão de proteínas em organismos do entremarés rochoso. A expressão proteica e a atividade enzimática de *Stramonita brasiliensis* foi influenciada pela temperatura superficial do mar, a produtividade primária e a exposição as ondas, sendo este o primeiro estudo a correlacionar estas atividades bioquímicas e os fatores oceanográficos. Desta forma, estes resultados abrem oportunidades para uma série de avaliações neste contexto interdisciplinar. De forma geral, ao se considerar o conhecimento sobre fatores oceanográficos e atividades metabólicas, outros estudos auxiliam a entender os processos aqui encontrados. Sabe-se que a temperatura e o tamanho dos organismo interferem em seu metabolismo (Brown et al., 2004), onde quanto maior a temperatura, maiores são as taxas de metabolismo (Gillooly et al., 2001). No entanto, Marshall & McQuaid (2010) propõem que invertebrados de costões rochosos reduzem suas taxas de metabolismo com o aumento da temperatura. Assim, apesar de não demonstrarem nenhuma mudança de comportamento, os organismos possuem adaptações específicas para resolver problemas relacionados a determinados tipos de estresse, especialmente ao estresse térmico (Halpin et al., 2002; Han et al., 2017; Helmuth et al., 2008; Lim et al., 2016; Prusina et al., 2014; Williams et al., 2008). Por sua vez concentração de Chl-a está relacionada com taxas de crescimento dos organismos, uma vez que quanto mais fitoplâncton, mais alimento para os filtradores (Bustamante et al., 1995; Menge et al., 1997) aumentando a entrada de energia na cadeia trófica, e favorecendo os organismos carnívoros como a *Stramonita sp.*

Apesar de neste trabalho os indivíduos de *Stramonita brasiliensis* apresentarem diferença de 1,4 vezes na massa sem a concha, a expressão de proteínas dos organismos coletados variou até 13 vezes entre os costões, indicando que diferentes fatores poderiam influenciar nessa variável. O teor proteico variou entre 0,4-5,8%, valores considerados mais baixos quando comparados a outros estudos (16-18,5%) com *Stramonita haemastoma* (Munhoz et al., 2018) ou outros gastrópodes carnívoros marinhos (Ab Lah et al., 2017; Belisle and Stickle, 1978).

O conteúdo nutricional em organismos marinhos varia não só individualmente, mas também por conta da situação do meio em que ele se encontra (Dawes et al., 1998). Aqui, avaliamos se a expressão de proteínas em *Stramonita brasiliensis* estaria associada a fatores oceanográficos.

A expressão de proteínas foi maior em organismos de áreas frias (TSM ~ 22,7 °C) do que em áreas mais quentes (TSM ~ 25,7 °C). Tate et al. (2017) testaram *Dicathais orbita*, um outro gastrópode marinho, em experimentos que mimetizaram o aquecimento e acidificação do oceano. Em temperaturas de 25°C (muito próxima a TSM para costões considerados quentes neste trabalho), comparadas com temperaturas de 22°C (muito próxima a TSM para costões considerados frios neste trabalho), os autores viram que a quantidade de proteínas diminuiu em torno de 54%, já que há uma diminuição do metabolismo desses organismos em temperaturas mais elevadas.

As menores concentrações de proteínas para áreas mais frias e mais quentes foram observadas em costões mais expostos às ondas com menores concentrações de Chl-a. Isso pode ser explicado tanto pela diminuição de fitoplâncton que resulta na diminuição das comunidades de organismos filtradores predados pela *S. brasiliensis* (Menge et al., 2002), como pela *Stramonita sp.* ser menos ativa em costões expostos. Como a *Stramonita brasiliensis* é mais ativa em costões abrigados (Menge, 1978) e há maior entrada de energia na cadeia trófica, em áreas frias, as maiores concentrações de proteínas nos organismos foram observadas em costões menos expostos às ondas e com maiores concentrações de Chl-a.

Já, em costões mais quentes, as maiores concentrações de proteínas na *Stramonita brasiliensis* foram observadas em extremos ambientais: em costões expostos às ondas com maiores concentrações de Chl-a, onde ela é menos ativa, mas tem mais energia disponível na cadeia trófica; e em costões menos expostos com menores concentrações de Chl-a, onde ela é mais ativa, mas tem menos energia disponível na cadeia trófica.

Nossos resultados mostraram que todos os 13 costões apresentaram organismos com os dois tipos de atividade enzimática. As proteases mais ativas

sobre o substrato Z-FR-AMC na *Stramonita brasiliensis* foram as serinoproteases e as metaloproteases. As serinoproteases podem ser encontradas em diversas partes do trato digestório dos organismos marinhos, como o intestino, pâncreas, ou glândulas digestórias e possuem as mais variadas funções como a quebra de proteínas que compõem as fibras musculares, participação de processos digestórios, de crescimento em larvas, coagulação sanguínea e processos imunológicos (Brauer et al., 2003; Di Cera, 2009; Nolting et al., 1998; Ueberschär, 1995). A inibição da atividade enzimática por EDTA (quelante de cátions bivalentes), mas não por lisinopril, indica que a atividade de metaloproteases presente nesses organismos se refere à atividade de metaloproteases dependentes de zinco. Entre essas enzimas temos as metaloproteases de matriz (Lee & Murphy, 2004), que são enzimas relacionadas à remodelação de tecidos e à degradação da matriz extracelular, ou as astacinas, que devem estar envolvidas em resposta inflamatória, desenvolvimento embrionário, proliferação e formação de conchas em moluscos (Xiong et al., 2006). Ainda foi observada uma atividade para aspartilproteases, que são encontradas principalmente no intestino e glândulas digestórias de organismos marinhos, participando da digestão de alimentos (Haard & Simpson, 2000).

A atividade específica de metaloproteases inibidas por EDTA foi verificada na hidrólise do substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp (Gesini, 2016). Esse substrato contém parte da sequência do nonapeptídeo bradicinina (GFSPFR), que está relacionado com diversas ações em mamíferos, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, inflamação, estimulação de nervos sensoriais (Maurer et al., 2011). A clivagem desse substrato por todos os extratos de *S. brasiliensis* abre perspectivas para novos estudos de biodescoberta nesses organismos, outro interesse do nosso grupo de pesquisa. Além disso, esses resultados abrem perspectivas tanto para estudos da atividade enzimática na presença de metais, quanto sobre a avaliação dos metais presentes nesses organismos. Os metais pesados podem, por exemplo, alterar a atividade enzimática, já que esse metal pode se ligar com o grupo funcional ou substituir o metal associado à enzima, o que causa mudança em seu desempenho (Viarengo, 1985). Como as metaloproteases astacinas estão envolvidas na formação de conchas e neste trabalho observamos um contraste na espessura das conchas da *S. brasiliensis* entre os costões, também

seria interessante estudar futuramente se existe algum tipo de relação entre a plasticidade fenotípica das conchas com a atividade de metaloproteases nos diferentes costões.

Como para expressão de proteínas, houve diferença nas duas atividades enzimáticas avaliadas entre os costões analisados. Essas variações podem acontecer por influência de diversos fatores (Fokina et al., 2018; Belisle & Stickle, 1978) e neste trabalho avaliamos as relações entre essas atividades e a expressão de proteínas e entre essas atividades e os fatores oceanográficos.

Verificamos que a atividade de proteases em geral é diretamente proporcional à atividade de metaloproteases. Provavelmente, entre as proteases que clivam o substrato Z-FR-AMC, estão as metaloproteases que clivam o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp. No entanto, tanto a atividade de proteases em geral quanto a atividade de metaloproteases é inversamente proporcional à expressão de proteínas. Esse resultado não era esperado e contrariou outro estudo que propõe que quanto maior a quantidade de aminoácidos, maior será a atividade enzimática (Anoother et al., 2019). Outros fatores que não a disposição de aminoácidos estão influenciando a atividade dessas proteases. Experimentos com *Stramonita haemastoma*, mostraram que a expressão de um outro tipo de enzimas, a óxido nítrico sintase, é alterada pelo aumento da temperatura, podendo aumentar ou diminuir, dependendo do tecido avaliado, mesmo após apenas duas horas de exposição à nova temperatura (Toni et al., 2015).

No passo seguinte, avaliamos se a atividade de proteases em *Stramonita brasiliensis* estaria associada a fatores oceanográficos. De acordo com nossos resultados, a atividade de proteases também teve relação com as variáveis avaliadas. A atividade de proteases em geral foi maior em organismos de costões mais frios do que em costões mais quentes, nos quais para costões mais quentes não houve relação entre essa atividade e os fatores oceanográficos.

Em áreas mais frias, a atividade enzimática sobre Z-FR-AMC foi maior em extremos ambientais: em costões rochosos menos expostos às ondas com menores concentrações de Chl-a, onde ela é mais ativa, mas tem menor entrada de energia na cadeia trófica; e em costões mais expostos às ondas com maiores concentrações de Chl-a, onde ela é menos ativa, mas tem maior entrada de energia

na cadeia trófica. Como temos diversas classes de proteases envolvidas nessa atividade, diferentes enzimas poderiam atuar nas duas situações. Para casos onde há menores concentrações de Chl-a e, portanto, menor disponibilidade de filtradores, a falta de alimentação pode diminuir a expressão de proteínas em situações de estresse (Jeno e Brokordt, 2014), além de afetar o crescimento de organismos juvenis de gastrópodes (Wacker & Baur, 2004). Em compensação, parte da atividade de proteases poderia estar envolvida no processo de gliconeogênese, onde as proteínas musculares da *Stramonita brasiliensis* estariam sendo hidrolisadas para a geração de glicose (Gabbot, 1983). Nos casos de maior entrada de energia na cadeia trófica, maiores concentrações de Chl-a, outras proteases poderiam auxiliar tanto no processo de forrageamento, como em processos digestivos. No entanto, isso não explicaria o fato de as menores atividades enzimáticas serem observadas em costões menos expostos e com maiores concentrações de Chl-a, onde além de mais ativa a *Stramonita brasiliensis* poderia ter mais alimento disponível. É importante ressaltar que o conteúdo bioquímico desses organismos pode variar também de acordo com as diferentes épocas em que os organismos foram coletados, onde fatores como temperatura, reprodutivos e disponibilidade de alimentos, podem ter variado (Fokina et al., 2018; Belisle & Stickle, 1978).

Apesar de apresentarem a menor expressão de proteínas, os costões de Ponta Cabeça e Prainha demonstraram as mais elevadas atividades enzimáticas. Destaca-se que, apesar desses dois costões estarem próximos à zona de ressurgência de Cabo Frio (Castelao & Barth, 2006), eles apresentaram valores baixos de Chl-a, indicando que suas proteases possam estar envolvidas em processos de inanição. Na ausência desses dois costões, apenas a TSM e o grau de exposição às ondas se relacionaram à atividade de proteases em geral. Assim para costões mais quentes há um aumento na atividade enzimática com um aumento no grau de exposição às ondas; em costões frios, há uma diminuição na atividade enzimática com um aumento no grau de exposição às ondas.

Para a atividade de metaloproteases sobre o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp observou-se um padrão diferente em relação à atividade de

proteases em geral sobre o substrato Z-FR-AMC. Para costões considerados mais quentes, quanto maior a concentração de Chl-a, maior a atividade das metaloproteases. As metaloproteases podem sofrer alterações na sua produção e atividade de acordo com o conteúdo nutricional do organismo, além da disponibilidade de nitrogênio na água (Amoozegar et al., 2006; Sumantha et al., 2006), o que poderia explicar esse aumento em locais com maior concentração de Chl-a. Mas, isso não explicaria o inverso que ocorre em costões mais frios, onde o aumento da concentração de Chl-a se relaciona a uma menor atividade das metaloproteases. No entanto, é importante lembrar que essas metaloproteases em moluscos estão envolvidas em processos de remodelação de tecidos, degradação da matriz extracelular, resposta inflamatória, proliferação celular e formação da concha.

Com relação à exposição às ondas, há um leve aumento da atividade de metaloproteases no gradiente de exposição, que é maior em costões mais quentes do que em costões mais frios. Quando as variáveis Chl-a e exposição são modeladas juntas, nos costões mais expostos, a atividade de metaloproteases nesses organismos diminui com o aumento da concentração de Chl-a. Sendo assim, quando a *Stramonita brasiliensis* estaria menos ativa e com maior entrada de energia na cadeia trófica, suas metaloproteases estariam menos ativas. Já em menores exposições às ondas, praticamente não há variação da atividade de metaloproteases no gradiente de Chl-a.

Esses resultados demonstram que os fatores oceanográficos influenciam a expressão de proteínas e a atividade de proteases em organismos marinhos quando expostos às condições . Foi visto neste estudo que as proteases apresentam diferentes respostas de acordo com a situação ambiental de costões rochosos e que as variáveis podem ou não exercer um efeito sinérgico na atividade enzimática. Por conta de seu dinamismo, fatores estressantes atuam de maneira conjunta, gerando diferentes respostas enzimáticas de acordo com o gradiente analisado, seja ele de temperatura, concentração de clorofila-a ou do grau de exposição às ondas.

Este estudo abre diversas perspectivas para futuros estudos com *Stramonita*, como avaliação da plasticidade das conchas e atividade de metaloproteases e estudos de biodescoberta envolvendo a purificação dessas metaloproteases. Pouco se sabe sobre o efeito de tantas mudanças no metabolismo de organismos marinhos, neste trabalho foi visto que em TSM a variação de 2 °C, afeta a atividade de proteases do gastrópode *Stramonita brasiliensis*. Este estudo consiste em mais um passo para maior compreensão de reações fisiológicas de organismos marinhos ao estresse ambiental e como preditor do efeito da temperatura nas em uma enzima que participa de processos relacionados ao crescimento e sobrevivência de todos os seres vivos.

6. Referências bibliográficas

- Ab Lah, R., Smith, J., Savins, D., Dowell, A., Bucher, D., Benkendorff, K., 2017. Investigation of nutritional properties of three species of marine turban snails for human consumption. *Food Science & Nutrition*, 5, 14–30.
- Amoozegar, M. A., Fatemi, A. Z., Karbalaeei-Heidari, H. R., & Razavi, M. R., 2007. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162(4), 369-377.
- Anootthato, S., Therdthai, N., & Ritthiruangdej, P., 2019. Characterization of protein hydrolysate from silkworm pupae (*Bombyx mori*). *Journal of Food Processing and Preservation*, e14021.
- Araújo, J. E., Madeira, D., Vitorino, R., Repolho, T., Rosa, R., & Diniz, M., 2018. Negative synergistic impacts of ocean warming and acidification on the survival and proteome of the commercial sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of sea research*, 139, 50-61.
- Arunachalam, C., & Saritha, K., 2009. Protease enzyme: An eco-friendly alternative for leather industry. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(12), 29-32.
- Bakus, G. J., Targett, N. M., & Schulte, B., 1986. Chemical ecology of marine organisms: an overview. *Journal of Chemical Ecology*, 12(5), 951-987
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., 2005. Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. *ChM* 382.
- Belisle, B.W., Stickle, W.B., 1978. Seasonal patterns in the biochemical constituents and body component indexes of the muricid gastropod, *Thais haemastoma*. *The Biological Bulletin*, 155, 259–272.
- Bjelde, B.E., Todgham, A.E., 2013. Thermal physiology of the fingered limpet *Lottia digitalis* under emersion and immersion. *Journal of Experimental Biology*, 216, 2858–2869.
- Bogan, S. N., McMahon, J. B., Pechenik, J. A., & Pires, A., 2019. Legacy of multiple stressors: responses of gastropod larvae and juveniles to ocean acidification and nutrition. *The Biological Bulletin*, 236(3).
- Boulding, E. G., Holst, M., Pilon, V., 1999. Changes in selection on gastropod shell size and thickness with wave-exposure on northeastern pacific shores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 232(2), 217-239.

- Boulding, E. G., & Van Alstyne, K. L., 1993. Mechanisms of differential survival and growth of two species of *Littorina* on wave-exposed and on protected shores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 169(2), 139-166.
- Brauer, J. M. E., Leyva, J. A. S., Alvarado, L. B., Sáñez, O. R., 2003. Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *European Food Research and Technology*, 217(4), 277-280.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., West, G. B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7), 1771-1789.
- Bulleri, F., Bruno, J.F., Silliman, B.R., Stachowicz, J.J., 2016. Facilitation and the niche: implications for coexistence, range shifts and ecosystem functioning. *Functional Ecology*, 30, 70–78.
- Burrows, M.T., Harvey, R., Robb, L., 2008. Wave exposure indices from digital coastlines and the prediction of rocky shore community structure. *Marine Ecology Progress Series* 353, 1–12.
- Burrows, M.T., Hughes, R.N., 1990. Variation in growth and consumption among individuals and populations of dogwhelks, *Nucella lapillus*: a link between foraging behaviour and fitness. *The Journal of Animal Ecology*, 723–742.
- Bustamante, R. H., Branch, G. M., Eekhout, S., 1997. The influences of physical factors on the distribution and zonation patterns of South African rocky-shore communities. *African Journal of Marine Science*, 18.
- Bustamante, R., Branch, G., 1996. Large scale patterns and trophic structure of southern African rocky shores: the roles of geographic variation and wave exposure. *Journal of Biogeography*, 23, 339–351.
- Bustamante, R.H., Branch, G.M., Eekhout, S., Robertson, B., Zoutendyk, P., Schleyer, M., Dye, A., Hanekom, N., Keats, D., Jurd, M., McQuaid, C., 1995. Gradients of intertidal primary productivity around the coast of South Africa and their relationships with consumer biomass. *Oecologia*, 102, 189–201.
- Castelao, R.M., Barth, J.A., 2006. Upwelling around Cabo Frio, Brazil: The importance of wind stress curl. *Geophysical Research Letters*, 33.
- Claremont, M., Williams, S. T., Barraclough, T. G., Reid, D. G., 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography*, 38(6), 1016-1032.

- Cordell, G. A., 2000. Biodiversity and drug discovery—a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55(6), 463-480.
- Costa, H. M., Júnior, A. C. F., Amaral, I. P., Hirata, I. Y., Paiva, P. M., Carvalho, L. B., ... , Bezerra, R. S., 2013. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 166.
- Davenport, J., Davenport, J. L., 2005. Effects of shore height, wave exposure and geographical distance on thermal niche width of intertidal fauna. *Marine Ecology Progress Series*, 292, 41–50.
- Dawes, C. J., Orduna-Rojas, J., Robledo, D., 1998. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. *Journal of Applied Phycology*, 10(5), 419.
- Dayton, P.K., 1971. Competition, disturbance, and community organization: the provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *Ecological Monographs* 41, 351–389.
- Díaz-López, M., & García-Carreño, F. L., 2000. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products. *Seafood enzymes*, 571-618.
- Dong, Y., Williams, G.A., 2011. Variations in cardiac performance and heat shock protein expression to thermal stress in two differently zoned limpets on a tropical rocky shore. *Marine biology*, 158, 1223–1231.
- Duarte, L., Guerrazzi, M., 2004. Zonação do costão rochoso da praia do Rio Verde: padrões de distribuição e abundância. *Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente físico, flora e fauna (OAV Marques & W. Duleba, eds.)*. Ribeirão Preto: Holos Editora 179–188.
- Findley, A. M., Belisle, B. W., Stickle, W. B., 1978. Effects of salinity fluctuations on the respiration rate of the southern oyster drill *Thais haemastoma* and the blue crab *Callinectes sapidus*. *Marine biology*, 49(1), 59-67.
- Flores, G., Cienfuegos, R., Navarrete, S. A., 2019. Beyond tides: surge-dominated submersion regimes on rocky shores of central Chile. *Marine Biology*, 166(7), 92.
- Fokina, N. N., Ruokolainen, T. R., Nemova, N. N., 2018. The effect of intertidal habitat on seasonal lipid composition changes in blue mussels, *Mytilus edulis* L., from the White Sea. *Polar Record*, 54(2), 133-151.

- Gabbott, P. A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In *The mollusca*, 165-217. Academic Press.
- Gambarini, V.O., Menezes Da Silva, L.C., Christofolletti, R., Araújo, M.S., Gozzo, A.J. 2014. Primeiros passos em bioprospecção de invertebrados marinhos da costa paulista: obtenção de inibidores de proteases. Congresso UNIFESP. Livro de Resumos, São Paulo
- Gesini, G. B. Proteases e seus inibidores em organismos marinhos: estudo em áreas impactadas e não impactadas, 2016, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar) - Universidade Federal de São Paulo, Santos.
- Gildberg, A., Simpson, B.K., Haard, N.F, 2000. Uses of enzymes from marine organisms. In *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* (N.F. Haard and B.K. Simpson, eds.). 619–639.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., Charnov, E. L., 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *science*, 293(5538), 2248-2251.
- Gonzalez-Rodriguez, E., Valentin, J.L., André, D.L., Jacob, S.A., 1992. Upwelling and downwelling at Cabo Frio (Brazil): comparison of biomass and primary production responses. *Journal of Plankton Research*, 14, 289–306.
- Haard, N. F., & Simpson, B. K., 2000. *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*. CRC Press.
- Haig, J. A., Pantin, J. R., Salomonsen, H., Murray, L. G., Kaiser, M. J., 2015. Temporal and spatial variation in size at maturity of the common whelk (*Buccinum undatum*). *ICES Journal of Marine Science*, 72(9), 2707-2719.
- Halpin, P. M., Menge, B. A., Hofmann, G. E., 2002. Fine-scale temporal and spatial variation in the heat shock response of mussels in nature. In *Integrative And Comparative Biology*, 42(6), 1239-1239.
- Han, G. D., Cartwright, S. R., Ganmanee, M., Chan, B. K., Adzis, K. A., Hutchinson, N., ... & Dong, Y. W. ,2019. High thermal stress responses of *Echinolittorina* snails at their range edge predict population vulnerability to future warming. *Science of the Total Environment*, 647, 763-771
- Helmuth, B., Wethey, D., Pincebourde, S., Smith, K., Szathmary, L., Woodin, S., Lakshmi, V., 2008. Ecological forecasting and hindcasting in the rocky intertidal zone: Where and when do we worry about weather?. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 3(150), S167.

- Hobday, A., 1995. Body-size variation exhibited by an intertidal limpet: Influence of wave exposure, tidal height and migratory behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189(1-2), 29-45.
- Hoefnagel, K. N., & Verberk, W. C., 2017. Long-term and acute effects of temperature and oxygen on metabolism, food intake, growth and heat tolerance in a freshwater gastropod. *Journal of thermal biology*, 68, 27-38.
- Homaei, A., Lavajoo, F., Sariri, R., 2016. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 542–552.
- Hughes, R.N., Dunkin, S. de B., 1984. Behavioural components of prey selection by dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), feeding on mussels, *Mytilus edulis* L., in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 77, 45–68.
- Hunt, H.L., Scheibling, R.E., 1998. Effects of whelk (*Nucella lapillus* (L.)) predation on mussel (*Mytilus trossulus* (Gould), *M. edulis* (L.)) assemblages in tidepools and on emergent rock on a wave-exposed rocky shore in Nova Scotia, Canada. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226, 87–113.
- Ishizaka, J., Takahashi, M., Ichimura, S., 1983. Evaluation of coastal upwelling effects on phytoplankton growth by simulated culture experiments. *Marine Biology*, 76(3), 271-278.
- Javahery, S., Noori, A., Hoseinifar, S.H., 2019. Growth performance, immune response, and digestive enzyme activity in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931, fed dietary microbial lysozyme. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 528–535.
- Jeno, K., & Brokordt, K., 2014. Nutritional status affects the capacity of the snail *Concholepas concholepas* to synthesize Hsp70 when exposed to stressors associated with tidal regimes in the intertidal zone. *Marine biology*, 161(5), 1039-1049.
- Joo, H. S., Park, G. C., Kim, K. M., Paik, S. R., & Chang, C. S., 2001. Novel alkaline protease from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 36(8), 893-900.
- Klomklao, S., 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 30.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K., 2006. Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. *Food chemistry*,

98(1), 14-22.

- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Simpson, B. K., & Kishimura, H., 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous twophase systems. *Process Biochemistry*, 40(9), 3061-3067.
- Kotta, D., Kitsiou, D., 2019. Chlorophyll in the Eastern Mediterranean Sea: Correlations with Environmental Factors and Trends. *Environments*, 6, 98.
- Lah, R. A., Benkendorff, K., Bucher, D., 2017. Thermal tolerance and preference of exploited turbinid snails near their range limit in a global warming hotspot. *Journal of thermal biology*, 64, 100-108.
- Lee, M.H, Murphy G., 2004. Matrix metalloproteinases at a glance. *Journal of Cell Science*, 117(18), 4015-4016.
- Leigh, E.G., Paine, R.T., Quinn, J.F., Suchanek, T.H., 1987. Wave energy and intertidal productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 1314–1318.
- Lehmann, A., Krauß, W., Hinrichsen, H. H., 2002. Effects of remote and local atmospheric forcing on circulation and upwelling in the Baltic Sea. *Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography*, 54(3), 299-316.
- Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z., Depledge, M. H., 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8(5), 351-368.
- Liu, C., Chiu, C., Ho, P., Wang, S., 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of applied microbiology*, 107, 1031–1041.
- Marshall, D. J., McQuaid, C. D., 2010. Warming reduces metabolic rate in marine snails: adaptation to fluctuating high temperatures challenges the metabolic theory of ecology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (1703), 281-288.
- Martin, G.G., Martin, A., Tsai, W., Hafner, J.C., 2011. Production of digestive enzymes along the gut of the giant keyhole limpet *Megathura crenulata* (*Mollusca: Vetigastropoda*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160, 365–373.
- Mcintyre, R., Lawler, A., Masefield, R., 2015. Size of maturity of the common whelk, *Buccinum undatum*: Is the minimum landing size in England too low? *Fisheries Research*, 162, 53–57.

- McLaren, B.E., Peterson, R.O., 1994. Wolves, moose, and tree rings on Isle Royale. *Science*, 266, 1555–1558.
- McQuaid, C., Branch, G., 1985. Trophic structure of rocky intertidal communities: response to wave action and implications for energy flow. *Marine Ecology Progress Series*, 153–161.
- McQuaid, C.D., Lindsay, J.R., Lindsay, T.L., 2000. Interactive effects of wave exposure and tidal height on population structure of the mussel *Perna perna*. *Marine Biology*, 137, 925–932.
- Menge, B.A., 1978. Predation intensity in a rocky intertidal community. *Oecologia*, 34, 1–16.
- Menge, B.A., Daley, B.A., Wheeler, P.A., Dahlhoff, E., Sanford, E., Strub, P.T., 1997. Benthic–pelagic links and rocky intertidal communities: bottom-up effects on top-down control? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 14530–14535.
- Menge, B.A., Farrell, T.M., 1989. Community Structure and Interaction Webs in Shallow Marine Hard-Bottom Communities: Tests of an Environmental Stress Model, in: Begon, M., Fitter, A.H., Ford, E.D., MacFadyen, A. (Eds.), *Advances in Ecological Research*. Academic Press, 189–262.
- Menge, B. A., Olson, A. M., Dahlhoff, E. P., 2002. Environmental stress, bottom-up effects, and community dynamics: integrating molecular-physiological and ecological approaches. *Integrative and Comparative Biology*, 42(4), 892-908.
- Mills, L.S., Soulé, M.E., Doak, D.F., 1993. The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience*, 43, 219–224.
- Munhoz, R.R, Cesarini, L.M, Tomita, R.Y, 2018. Gastrópode *Stramonita haemastoma* utilizado na alimentação humana. In: VIII Simpósio de controle de qualidade do pescado, Santos, São Paulo: Instituto da pesca, 2018.
- Navarrete, S.A., Menge, B.A., 1996. Keystone Predation and Interaction Strength: Interactive Effects of Predators on Their Main Prey. *Ecological Monographs* 66, 409–429.
- Nolting, R. F., Gerringa, L. J. A., Swagerman, M. J. W., Timmermans, K. R., De Baar, H. J. W. ,1998. Fe (III) speciation in the high nutrient, low chlorophyll Pacific region of the Southern Ocean. *Marine Chemistry*, 62(3-4), 335-352.
- Prusina, I., Sarà, G., De Pirro, M., Dong, Y. W., Han, G. D., Glamuzina, B., Williams, G. A. 2014. Variations in physiological responses to thermal stress in

congeneric limpets in the Mediterranean Sea. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 456, 34-40.

Ribeiro, C. C., Braga, A. A., Nunes, E. T., Madureira, A. P., Bertini, G., 2019. The *anomuran* and *brachyuran* communities (*Crustacea: Decapoda*) in sheltered and exposed rocky shores from Anchieta and Guarapari regions (Espírito Santo), Brazil. *Latin american journal of aquatic research*, 47(3), 467-479.

Rawlings, T. A., 1999. Adaptations to physical stresses in the intertidal zone: the egg capsules of *neogastropod* molluscs. *American Zoologist*, 39(2), 230–243.

Rawlings, N. D., & Bateman, A., 2019. Origins of peptidases. *Biochimie*, 166, 4-18.

Rilov, G., Gasith, A., Benayahu, Y., 2005. Effect of disturbance on foraging: whelk activity on wave-exposed rocky shores with minimal tidal range. *Marine Biology*, 147(2), 421–428

Sánchez-Nuño, S., Sanahuja, I., Fernández-Alacid, L., Ordóñez-Grande, B., Carbonell, T., Ibarz, A., 2019. Oxidative attack during temperature fluctuation challenge compromises liver protein homeostasis of a temperate fish model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 236, 110311.

Scrosati, R. A., Freeman, M. J., 2019. Density of intertidal barnacles along their full elevational range of distribution conforms to the abundant-centre hypothesis. *PeerJ*, 7, 6719.

Shamsuzzaman, K., & Haard, N.F., 1985. Milk clotting activity and cheese making properties of a chymosin-like enzyme from harp seal, *Pagophilus groenlandicus*. *Journal of Food Biochemistry*, 9(3), 173-192.

Sokolova, I., 2018. Mitochondrial Adaptations to Variable Environments and Their Role in Animals' Stress Tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 58, 519–531.

Southward, A.J., 1958. The zonation of plants and animals on rocky sea shores. *Biological Reviews*, 33, 137–177.

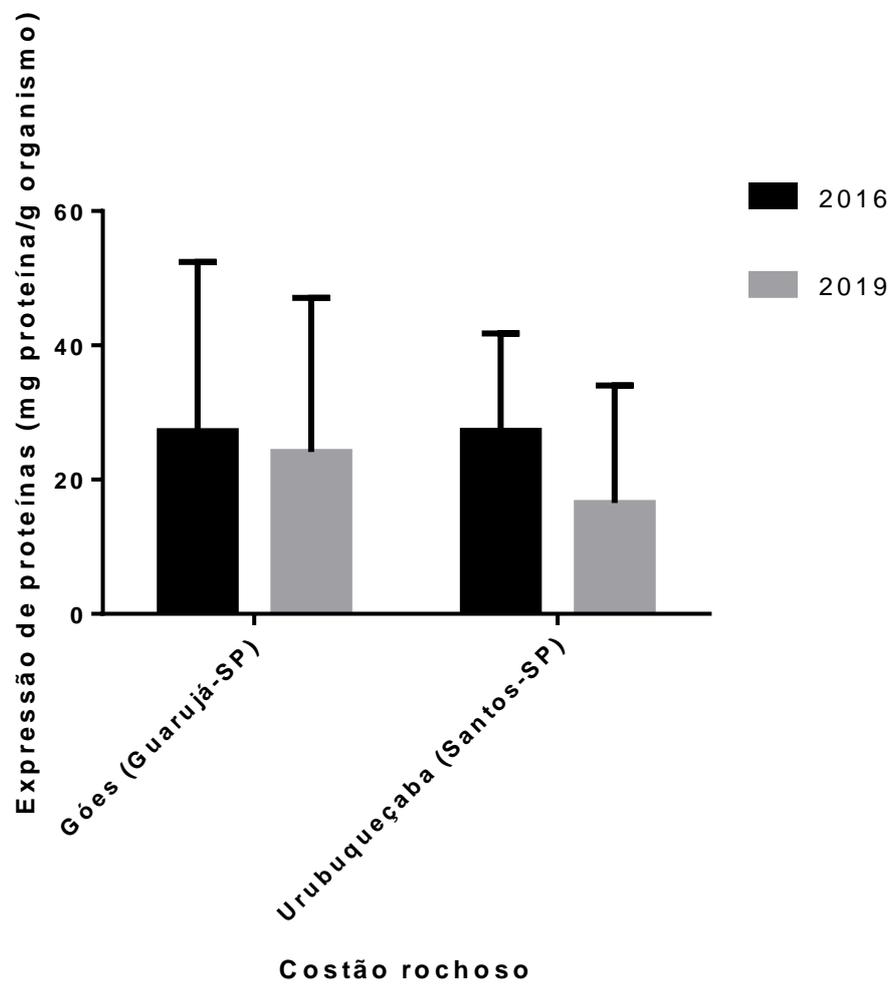
Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A., 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211

Tate, R. D., Benkendorff, K., Ab Lah, R., Kelaher, B. P., 2017. Ocean acidification and warming impacts the nutritional properties of the predatory whelk,

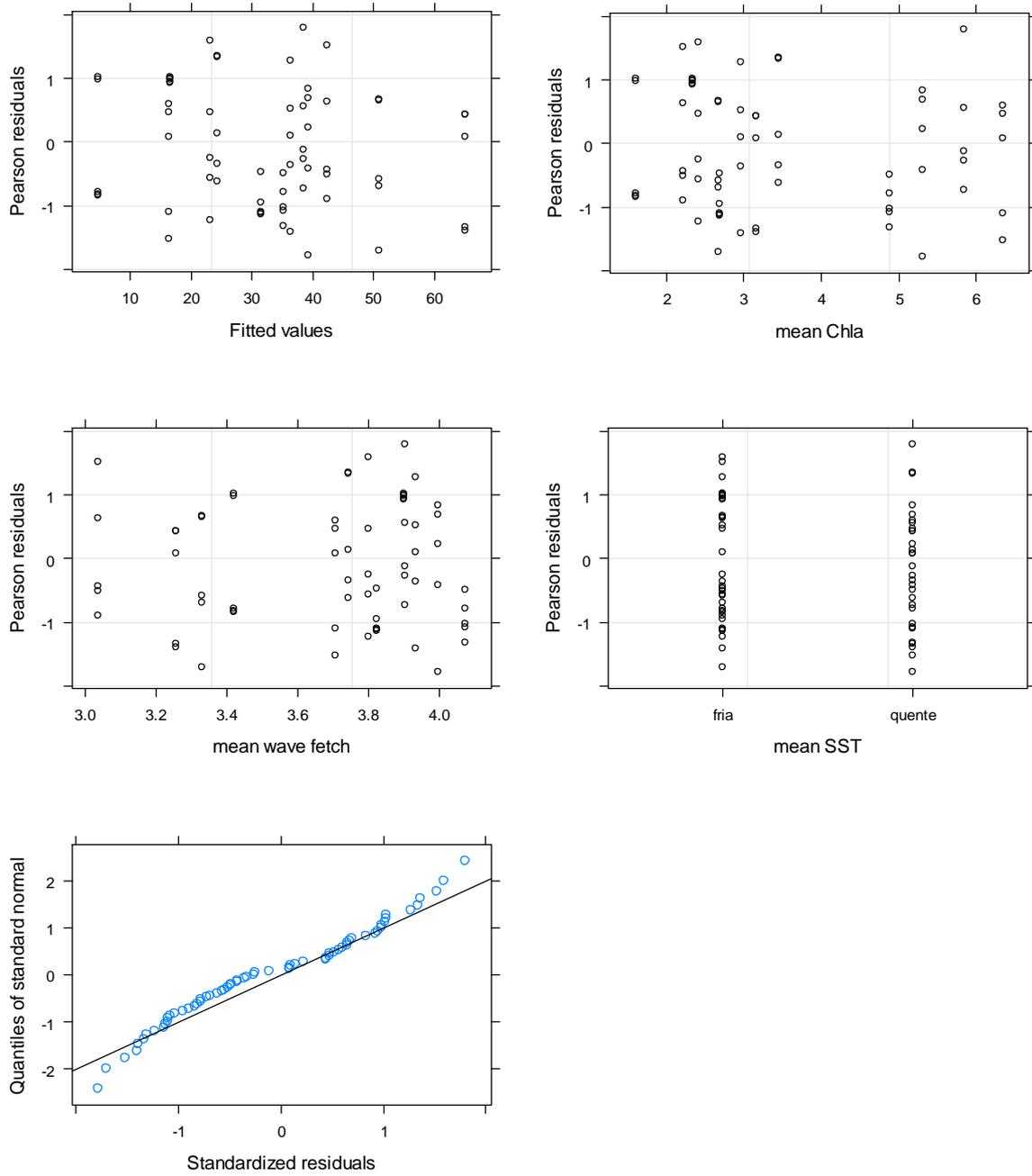
- Dicathais orbita*. Journal of experimental marine biology and ecology, 493, 7-13.
- Tavano, O. L., 2013. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 90, 1-11.
- Tomanek, L., 2014. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. Journal of proteomics, 105, 92–106.
- Tomanek, L., 2010. Environmental Proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. Annu. Rev. Mar. Sci. 3, 373–399.
- Tomanek, L., Sanford, E., 2003. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (*genus: Tegula*). The Biological Bulletin, 205, 276–284.
- Tomanek, L., Helmuth, B., 2002. Physiological ecology of rocky intertidal organisms: a synergy of concepts. Integrative and Comparative Biology 42, 771–775.
- Toni, M., De Angelis, F., di Patti, M., Cioni, C., 2015. Nitric Oxide Synthase in the Central Nervous System and Peripheral Organs of *Stramonita haemastoma*: Protein Distribution and Gene Expression in Response to Thermal Stress. Marine drugs, 13(11), 6636-6664.
- Turk, B., 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nature reviews Drug discovery, 5(9), 785.
- Ueberschär, B., 1995. The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. In ICES Marine Science Symposia, 201, 119-129. ICES.
- Ulloa, O., Escribano, R., Hormazabal, S., Quinones, R. A., González, R. R., Ramos, M., 2001. Evolution and biological effects of the 1997–98 El Niño in the upwelling ecosystem off northern Chile. Geophysical Research Letters, 28(8), 1591-1594.
- Valentin, J. L., Andre, D. L., Jacob, S. A., 1987. Hydrobiology in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: two-dimensional structure and variability during a wind cycle. Continental Shelf Research, 7(1), 77-88.
- Valentin, J. L., 2001. The Cabo Frio upwelling system, Brazil. In Coastal marine ecosystems of Latin America. Springer, 97-105.
- Valles-Regino, R., Tate, R., Kelaher, B., Savins, D., Dowell, A., & Benkendorff, K., 2015. Ocean warming and CO₂-induced acidification impact the lipid content

- of a marine predatory gastropod. *Marine drugs*, 13(10), 6019-6037.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine pollution bulletin*, 16(4), 153-158.
- Wacker, A., & Baur, B., 2004. Effects of protein and calcium concentrations of artificial diets on the growth and survival of the land snail *Arianta arbustorum*. *Invertebrate reproduction & development*, 46(1), 47-53.
- Watanabe, J.T., Young, C.M., 2006. Feeding habits and phenotypic changes in proboscis length in the southern oyster drill, *Stramonita haemastoma* (*Gastropoda: Muricidae*), on *Florida sabellariid* worm reefs. *Marine biology* 148, 1021–1029.
- Williams, G. A., De Pirro, M., Leung, K. M., & Morritt, D., 2005. Physiological responses to heat stress on a tropical shore: the benefits of mushrooming behaviour in the limpet *Cellana grata*. *Marine Ecology Progress Series*, 292, 213-224.
- Xiong, X., Chen, L., Li, Y., Xie, L., & Zhang, R., 2006. Pf-ALMP, a novel astacin-like metalloproteinase with cysteine arrays, is abundant in hemocytes of pearl oyster *Pinctada fucata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1759(11-12), 526-534.
- Zuur, A., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., Smith, G. M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer Science & Business Media.

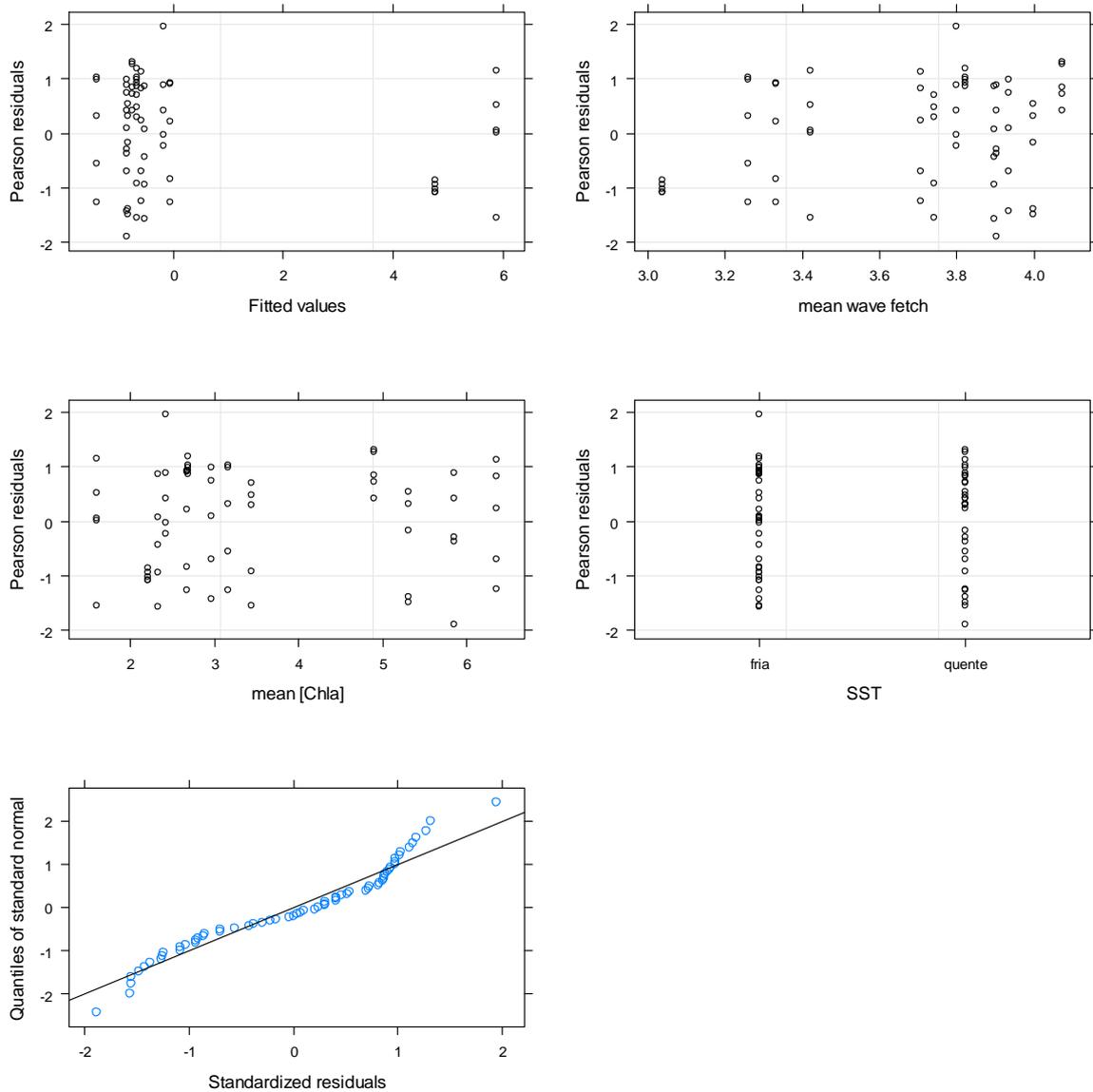
Anexo A. Comparação da expressão de proteínas de organismos coletados em 2016 em dois costões rochosos com extratos preparados em 2016 e 2019



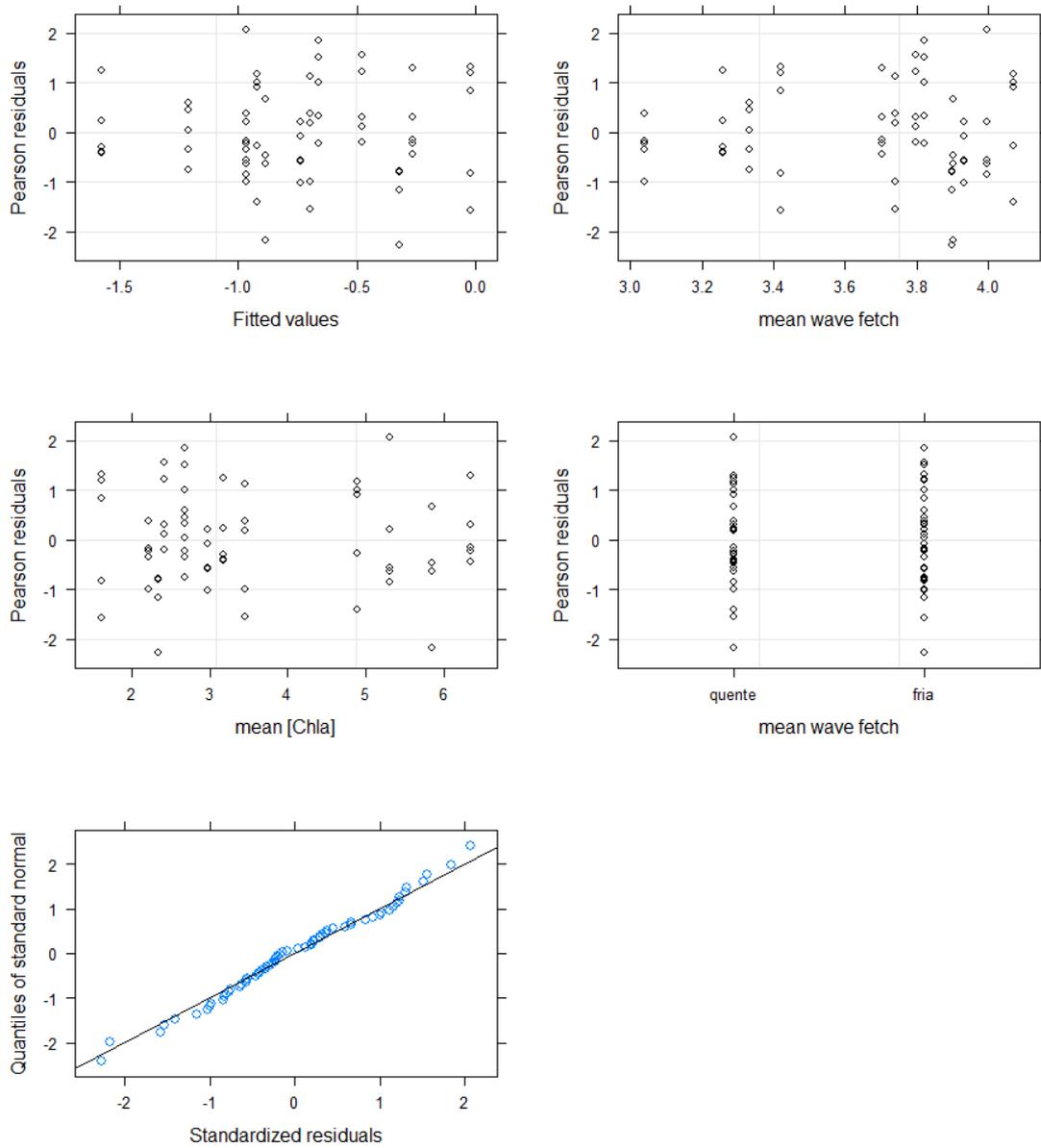
Anexo B. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Expressão de proteínas para os 13 costões analisados



Anexo C. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Atividade enzimática sob o substrato Z-FR-AMC nos 13 costões analisados



Anexo D. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Atividade enzimática sob o substrato Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnp nos 13 costões analisados



Anexo E. Validação do modelo estatístico para: variáveis ambientais X Atividade enzimática sob o substrato Z-FR-AMC em 11 costões rochosos.

